

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DOS RECÉM-
NASCIDOS NAS PRIMEIRAS 72 HORAS DE
VIDA DE ACORDO COM A IDADE
GESTACIONAL E DESFECHOS ASSOCIADOS
À PREMATURIDADE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LAURA GOERGEN BRUST RIECK

Porto Alegre, Brasil

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DOS RECÉM-
NASCIDOS NAS PRIMEIRAS 72 HORAS DE
VIDA DE ACORDO COM A IDADE
GESTACIONAL E DESFECHOS ASSOCIADOS
À PREMATURIDADE**

LAURA GOERGEN BRUST RIECK

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Silveira

Coorientador: Prof. Dr. Renato Soibelman Procianoy

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Rieck, Laura Goergen Brust
Atividade Inflamatória dos Recém-nascidos nas
Primeiras 72 horas de Vida de Acordo com a Idade
Gestacional e Desfechos Associados à Prematuridade /
Laura Goergen Brust Rieck. -- 2020.
88 f.
Orientadora: Rita de Cássia dos Santos Silveira.

Coorientador: Renato Soilbelmann Procianoy.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Recém-nascido. 2. Recém-nascido Prematuro. 3.
Citocinas. 4. Inflamação. 5. Dissertação de Mestrado.
I. Silveira, Rita de Cássia dos Santos, orient. II.
Procianoy, Renato Soilbelmann, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

11 / 03 / 2020

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Profa. Dra. Mariana González de Oliveira
Departamento de Pediatria
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Andrea Lúcia Corso
Departamento de Pediatria e Puericultura
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Clécio Homrich da Silva
Departamento de Pediatria e Puericultura/PPGSCA
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo incansável apoio.
Ao meu marido, pela paciência infindável.
Ao meu amado Timóteo, que me impulsiona a
seguir em frente com cada "chute" que dá.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua Graça infindável.

Ao meu marido, Felipe, por estar ao meu lado em todos os momentos, por ensinar-me caminhos novos e pela incessante ajuda neste momento.

Aos meus pais, Elaine e Ingo, pelo apoio e incentivo à educação ao longo destes anos, por todos os colos e por todo amor que sempre demonstraram.

À minha irmã e melhor amiga, Priscila, que mesmo com dois filhos pequenos não poupou esforços para ver essa etapa concluída.

À minha orientadora, Professora Rita de Cássia Silveira, exemplo de profissional, pela paciência, dedicação e incentivo; por ter me acolhido além das orientações científicas e acreditar sempre no meu potencial.

A meu coorientador, Professor Renato Procianoy, pelo exemplo como neonatologista e professor, sempre com um acréscimo importante nas orientações para a finalização deste trabalho.

À Professora Andrea Lucia Corso, pelo apoio e acolhimento em todos os momentos.

À equipe médica da UTI Neonatal e Alojamento Conjunto do HCPA, exemplos na minha formação e que auxiliaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho.

À equipe multiprofissional da UTI Neonatal e Alojamento Conjunto e à equipe de coleta do HCPA, por receberem-me de braços abertos e ajudarem na coleta do material estudado.

À equipe da UAMP, essenciais para a análise das amostras, e que sempre de bom humor me apoiaram em todo o momento. Em especial ao Hugo Bock, pela paciência e dedicação nas análises e à chefia da unidade, Michael Andrades e à coordenadora do Centro de Pesquisa Experimental, Professora Úrsula Matte, que ajudaram a superar os obstáculos encontrados.

Às secretárias do Serviço de Neonatologia, Eliane e Patrícia, pelo apoio logístico.

Ao CNPq e FINEP-HCPA, pelo financiamento da pesquisa.

Aos pacientes e familiares, sem os quais não teria sido possível realizar este trabalho, e que mesmo frente a uma situação emocional intensa demonstraram interesse em participar na pesquisa.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, professores e funcionários, onde tracei toda a minha carreira acadêmica, pelos ensinamentos transmitidos.

"Tu criaste o íntimo do meu ser e me teceste no ventre de minha mãe. Graças te dou, visto que por modo assombrosamente maravilhoso me formaste; as tuas obras são admiráveis, e a minha alma o sabe muito bem. Os teus olhos me viram a substância ainda informe, e no teu livro foram escritos todos os meus dias, cada um deles escrito e determinado, quando nem um deles havia ainda." Salmo 139:13-14;16

RESUMO

Introdução: Inflamação perinatal tem sido associada à prematuridade. Todavia, o perfil inflamatório dos recém-nascidos pré-termo e a termo não está completamente elucidado.

Objetivo: Avaliar a atividade inflamatória dos recém-nascidos nas primeiras 72 horas de vida e sua influência em desfechos clínicos associados à prematuridade. **Métodos:** Obtida amostra de sangue nas primeiras 72 horas de vida de recém-nascidos pré-termo e a termo nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, divididos em três grupos: Grupo 1 recém-nascidos com idade gestacional < 28 semanas; Grupo 2 recém-nascidos com idade gestacional \geq 28 semanas e < 33 semanas; Grupo 3 recém-nascidos a termo com idade gestacional \geq 38 semanas. Verificou-se os níveis de 7 citocinas para estes pacientes (Interleucina-1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-8 (IL-8), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Fator de Transformação de Crescimento- β 1 (TGF- β 1) e Fator de Transformação de Crescimento- β 2 (TGF- β 2)) por meio de imunoenensaio através de tecnologia multiplex. Malformações ou infecções congênitas; síndromes genéticas; mães portadoras do vírus HIV e recém-nascidos a termo que internaram em Unidade Neonatal foram excluídos. Realizada análise de variância para avaliar a influência da idade gestacional nos níveis de cada citocina e análise de covariância controlando para corioamnionite e pré-eclâmpsia. Para avaliar a influência das citocinas sobre os desfechos clínicos, correlação bivariada de Pearson e regressão logística. **Resultados:** Incluídos 103 recém-nascidos; Grupo 1 n=29; Grupo 2 n=37; Grupo 3 n=37. TNF- α , IL-8, IL-6 e TGF- β 1 e TGF- β 2 apresentaram diferenças entre os recém-nascidos pré-termo e a termo. IL-10 foi maior no Grupo 2 em relação ao Grupo 1. Controlando para pré-eclâmpsia e corioamnionite, o Grupo 3 apresentou níveis de TNF- α superiores em relação aos outros grupos e níveis de TGF- β 1 superiores em relação ao Grupo 1; Grupo 1 apresentou IL-8 superior ao Grupo 2. O aumento de uma unidade nos níveis de IL-8 aumentou a chance de desenvolver DBP em 6 vezes e o aumento de uma unidade de TGF- β 1 reduziu esta chance em 0.03 vezes; o aumento de uma unidade nos níveis de IL-6 aumentou a chance de desenvolver ROP em 16 vezes. **Conclusão:** Há diferenças significativas no perfil inflamatório de recém-nascidos a termo em relação a recém-nascidos pré-termo nos primeiros dias de vida, que estão relacionadas aos desfechos clínicos associados à prematuridade.

Estudo financiado pelo CNPq e FIPE-HCPA.

Palavras-chave: Recém-nascido. Recém-nascido Prematuro. Citocinas. Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Perinatal inflammation has been associated with prematurity. However, the inflammatory profile of preterm and full-term newborns is not completely elucidated. **Objective:** To assess newborn inflammatory activity in the first 72 hours of life and its influence on clinical outcomes associated with prematurity. **Methods:** Blood sample was obtained in the first 72 hours of life from premature and full-term newborns born at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, divided into three groups: Group 1 newborns with gestational age <28 weeks; Group 2 newborns with gestational age ≥ 28 weeks and <33 weeks; Group 3, full-term newborns with gestational age ≥ 38 weeks. Seven cytokines were measured for these patients (Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) and Transforming Growth Factor- β 2 (TGF- β 2)) through immunoassay in multiplex technology. Congenital malformation or infections; genetic syndromes; mothers with HIV virus; and full-term newborns admitted to the Neonatal Unit were excluded. We performed analysis of variance to assess gestational age influence for each cytokine and analysis of covariance controlling for chorioamnionitis and preeclampsia. To evaluate cytokines influence in clinical outcomes Pearson correlation was performed and logistic regression. **Results:** 103 newborns were included; Group 1 n=29; Group 2 n=37; Group 3 n=37. TNF- α , IL-8, IL-6 e TGF- β 1 e TGF- β 2 showed differences between preterm and full-term newborns. IL-10 was higher in Group 2 compared to Group 1. Controlling for preeclampsia and chorioamnionitis, Group 3 had higher TNF- α levels compared to the other groups and higher TGF- β 1 levels compared to Group 1; Group 1 had higher IL-8 levels compared to Group 2. An increase in one unit of IL-8 increased 6 times the chance to develop DBP and the increase in one unit of TGF- β 1 decreased this chance by 0.33 times; the increase in one unit of IL-6 increased 16 times the chance to develop ROP. **Conclusion:** There are significant differences between the inflammatory profile of full-term and preterm newborns in the first days of life, which are related to clinical outcomes associated with prematurity.

This work was supported by grants from CNPq and FIPE-HCPA.

Key Words: Newborn. Preterm newborn. Cytokine. Inflammation.

LISTA DE TABELAS

<i>Table 1 - Maternal, perinatal and neonatal characteristics in the study groups.....</i>	74
<i>Table 2 - Outcomes according to gestational age.....</i>	75
<i>Table 3 - Inflammatory activity in the first 72 hours after birth according to gestational age.....</i>	76
<i>Table 4 - Correlation between outcomes and inflammatory activity.....</i>	77
<i>Table 5 - Predictive value of cytokines for BPD and ROP: two independently significant outcomes.....</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIG	Adequado para Idade Gestacional
ANOVA	Análise de Variância
ANCOVA	Análise de Covariância
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAMP	Padrões Moleculares Associados a Danos
DBP	Displasia Broncopulmonar
ECN	Enterocolite Necrosante
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
GIG	Grande para Idade Gestacional
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPIV	Hemorragia Peri-intraventricular
IL	Interleucina
LPV	Leucomalácia Periventricular
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PIG	Pequeno para Idade Gestacional
ROP	Retinopatia da Prematuridade
RPM	Rotações por Minuto
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
STORCH	Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes
TGF	Fator de Transformação de Crescimento
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UAMP	Unidade de Amostras de Pesquisa
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO NO RECÉM-NASCIDO.....	25
2.1.1 TNF- α	26
2.1.2 IL-1 β	27
2.1.3 IL-6.....	28
2.1.4 IL-8.....	28
2.1.5 IL-10.....	29
2.1.6 TGF- β	30
2.2 PREMATURIDADE.....	30
2.3 O PROCESSO INFLAMATÓRIO NO RECÉM-NASCIDO PRÉ-TERMO	31
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GERAL.....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5 HIPÓTESES	39
6 MÉTODO.....	41
6.1 DELINEAMENTO.....	41
6.2 PARTICIPANTES	41
6.2.1 Critérios de exclusão	41
6.2.1.1 Para todos os participantes	41
6.2.1.2 Critério adicional exclusivo para os recém-nascidos a termo	41
6.3 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS	42
6.3.1 Variáveis laboratoriais.....	42

6.3.2 Variáveis clínicas.....	42
6.4 CÁLCULO DO TAMANHO DE AMOSTRA.....	44
6.5 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DE DADOS.....	45
6.5.1 Análise das Variáveis Laboratoriais	45
6.5.2 Análise estatística	46
6.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	47
7 REFERÊNCIAS.....	49
8 ARTIGO	57
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
ANEXO A – PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS	81
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	85
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO RECÉM-NASCIDO A TERMO	87

1 INTRODUÇÃO

O nascimento prematuro é uma situação cada vez mais comum, com grandes impactos na sociedade, tanto por ocasião do nascimento quanto por comorbidades que estes pacientes apresentam ao longo da vida quando sobrevivem. Estima-se que, mundialmente, em torno de 15 milhões de recém-nascidos nasçam pré-termo a cada ano, o que corresponde a aproximadamente 10,6% dos nascimentos (CHAWANPAIBOON *et al.*, 2019) e a perspectiva é que este número aumente cada vez mais. No Brasil, estima-se que a taxa de prematuridade seja de 11.5%, o que aproxima-se das estimativas globais (LEAL *et al.*, 2016).

Devido à melhoria na assistência aos recém-nascidos pré-termo, o número de pacientes que sobrevivem tem aumentado progressivamente; porém esta sobrevivência ainda está associada a uma alta morbidade, com um impacto significativo na qualidade de vida destes pacientes e seus familiares. Estes fatos nos alertam para a importância de compreender melhor as diferenças entre os recém-nascidos a termo e os pré-termo, com o intuito de melhorar o atendimento a estes pacientes e conseqüentemente sua qualidade de vida.

O nascimento é um momento de estresse para o feto, com uma série de mudanças adaptativas no seu organismo. Através de diversos estudos que avaliaram a presença de marcadores inflamatórios no líquido amniótico, placenta e cordão umbilical, sabemos que este é um momento em que uma cascata desses marcadores são ativados e liberados (LYON *et al.*, 2010; NESIN; CUNNINGHAM-RUNDLES, 2000; OPSJØN *et al.*, 1993). Essa ativação da cascata inflamatória pode ser mantida nos primeiros dias de vida e, quando associada a fatores capazes de perpetuá-la, é capaz de trazer repercussões para o recém-nascido, sendo um dos fatores contribuintes para as patologias associadas à prematuridade.

O entendimento da condição inflamatória em que o recém-nascido se encontra pode contribuir para a compreensão de patologias manifestas em recém-nascidos pré-termo e conseqüentemente auxiliar em um melhor manejo e prevenção destas doenças. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade inflamatória dos recém-nascidos pré-termo, comparando-a com a de recém-nascidos a termo, sem comorbidades, bem como avaliar o impacto das alterações inflamatórias dos recém-nascidos pré-termo nos desfechos associados à prematuridade, entendendo que, ao observarem-se diferenças entre estes dois grupos e associações entre a condição inflamatória dos recém-nascidos pré-termo e seus desfechos, mais um passo seja dado para melhorar a assistência a este grupo de recém-nascidos tão vulnerável.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO NO RECÉM-NASCIDO

Inflamação é uma resposta do organismo a um processo infeccioso ou a uma lesão tecidual capazes de ativar o sistema imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017). O feto e o recém-nascido dependem principalmente de componentes da imunidade inata, visto que a imunidade adaptativa não está plenamente desenvolvida nesta fase; uma das primeiras formas de resposta imune é a fagocitose através dos macrófagos, que leva à liberação de fatores inflamatórios (LYON *et al.*, 2010). Após a detecção de sinais de alerta pelas células responsáveis pela imunidade (macrófagos, neutrófilos, células *natural killer*, entre outras) a resposta inflamatória tem início. Os sinais de alerta podem ser caracterizados em dois subtipos principais, padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e padrões moleculares associados a danos (DAMP). PAMP são associados a processos infecciosos e são estruturas de agentes infecciosos capazes de estimular a imunidade, entre elas estão lipídeos de parede celular, proteínas de bactérias e ácidos nucleicos de vírus (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). DAMP são relacionados com uma resposta a lesão ou outros eventos inflamatórios, como queimaduras ou trauma por exemplo, e são componentes celulares endógenos capazes de ativar o sistema imune, liberados após estresse tecidual (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017).

Ao nascimento, o feto é submetido a um estímulo de estresse que desencadeia uma resposta inflamatória (GOTSCH *et al.*, 2007; LYON *et al.*, 2010; NESIN; CUNNINGHAM-RUNDLES, 2000; SARANDAKOU *et al.*, 1998). Essa resposta inflamatória é inicialmente mediada principalmente pelas citocinas. Diversos estudos mostram alterações nas citocinas dosadas em sangue materno, em placenta e em cordão umbilical (LYON *et al.*, 2010; OPSJØN *et al.*, 1993). Apesar de ser uma resposta normal ao processo do nascimento, quando essa resposta inflamatória sistêmica no feto e recém-nascido encontra-se alterada, ela pode estar associada a consequências como lesão em tecido pulmonar, intestinal ou cerebral, a curto e longo prazo (GOTSCH *et al.*, 2007; LEVITON *et al.*, 2012).

Citocinas são proteínas secretadas por células do sistema imunológico e agem principalmente como mediadoras da resposta imune e inflamatória, apesar de participarem também como estimuladoras da hematopoiese fetal e na maturação de órgãos fetais (ABBAS;

LICHTMAN; PILLAI, 2017; LYON *et al.*, 2010; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). Elas controlam a resposta inflamatória através de mecanismos pró-inflamatórios e também anti-inflamatórios, no intuito de otimizar a resposta do organismo ao agente agressor. Sabe-se que um desbalanço neste controle pró e anti-inflamatório pode trazer consequências ao organismo através, por exemplo, de uma resposta inflamatória exagerada que pode levar ao desenvolvimento de um quadro grave de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) ou mesmo através do desenvolvimento de um quadro de autoimunidade.

Estudos que analisaram a resposta das citocinas a agentes agressores observaram que cada uma tem um momento diferente de liberação, atingindo seu pico e nadir em um tempo diferente, mas tendo em comum uma meia-vida curta (ANDERSON; BLUMER, 1997; DEMBINSKI *et al.*, 2003; SCHULTZ *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2010). Para efeitos de estudos, citocinas são classificadas conforme seu efeito principal em pró e anti-inflamatórias (LYON *et al.*, 2010). Dentre as citocinas analisadas neste estudo, as pró-inflamatórias são Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-8 (IL-8) e Interleucina-6 (IL-6); e as anti-inflamatórias são Interleucina-10 (IL-10), Fator de Transformação de Crescimento- β 1 (TGF- β 1) e Fator de Transformação de Crescimento- β 2 (TGF- β 2). Mais detalhes sobre cada citocina são abordados abaixo.

2.1.1 TNF- α

Uma das principais citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α é um marcador inicial de inflamação sistêmica, desencadeando uma resposta inflamatória local, ativando células inflamatórias e desencadeando uma sinalização para a liberação de outras citocinas, como IL-1 β e IL-6 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). Também apresenta um efeito de *feedback* positivo, agindo como um estímulo para mais liberação de TNF- α . Além de um efeito local, o TNF- α , quando em concentrações altas, tem ação sistêmica, gerando estímulos pirogênicos, ativando o sistema de coagulação e suprimindo a maturação da medula óssea (ANDERSON; BLUMER, 1997). Quando em concentrações muito altas, está associado a quadros de choque, ao ter efeito no sistema cardiovascular, podendo estimular depressão miocárdica, hipotensão e quadros de coagulação intravascular disseminada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; ANDERSON; BLUMER, 1997).

No feto, ele é produzido pelas células de Kupffer e células placentárias mononucleares (NESIN; CUNNINGHAM-RUNDLES, 2000; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). No líquido amniótico, observou-se um aumento desta citocina com ruptura prematura de membranas, trabalho de parto prematuro e aborto (SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). Monócitos presentes no cordão umbilical também são responsáveis por secretar TNF- α . Em um estudo foi possível demonstrar que para recém-nascidos pré-termo a produção de TNF- α pelos monócitos do cordão umbilical é menor que a produção de recém-nascidos a termo e adultos (FÖRSTER-WALDL *et al.*, 2005). Estudos com recém-nascidos a termo comparando amostra de sangue de cordão e sangue periférico observaram que esta citocina já está elevada nos recém-nascidos ao nascimento, com um aumento nos primeiros dias de vida, o que sugere um processo inflamatório associado ao nascimento, com ativação do sistema imune do recém-nascido (PROTONOTARIOU *et al.*, 1999; SARANDAKOU *et al.*, 1998).

2.1.2 IL-1 β

Também uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes e de liberação inicial em processos inflamatórios, a IL-1 β tem ação semelhante ao TNF- α , estimulando a síntese de outros mediadores inflamatórios (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). Sua ação está também relacionada à estimulação da produção de prostaglandinas, sendo possivelmente uma das citocinas responsáveis por desencadear o trabalho de parto (MALAMITSI-PUCHNER *et al.*, 2005; NESIN; CUNNINGHAM-RUNDLES, 2000). Quando estimulada por endotoxinas *ex vivo*, observou-se que o pico de IL-1 β ocorre logo após o pico da TNF- α , em torno de duas horas após a estimulação, sendo indetectável após três horas e meia, na ausência de estímulo persistente (ANDERSON; BLUMER, 1997).

Assim como o TNF- α , no feto a IL-1 β é produzida pelas células de Kupffer e está presente no líquido amniótico, com um dos estímulos para sua produção sendo a ruptura prematura de membranas (SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). Também é produzida por monócitos e diversos outros tipos celulares, como células endoteliais e epiteliais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017). Sarandakou e colaboradores (1998) demonstraram que em recém-nascidos a termo, IL-1 β encontra-se elevada no primeiro dia de vida, comparada com valores observados em adultos.

2.1.3 IL-6

IL-6 é uma importante citocina pró-inflamatória, com efeitos locais e sistêmicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017). Ela tem efeitos inflamatórios, participa na resposta imune, atua na hematopoiese e também na transição da resposta imune aguda para a resposta imune crônica (NESIN; CUNNINGHAM-RUNDLES, 2000; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). Sua produção é estimulada em resposta a PAMP e também por outras citocinas, como TNF- α e IL-1 β (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). À semelhança do IL-1 β e TNF- α , ela também é produzida pelas células de Kupffer, monócitos, fibroblastos e células vasculares endoteliais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017).

Diversos estudos a identificaram no líquido amniótico e cordão umbilical (OTSUBO *et al.*, 2017; ROMERO *et al.*, 2016a; SARANDAKOU *et al.*, 1998; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). O aumento de IL-6 em sangue de cordão umbilical é utilizado para caracterizar a síndrome da resposta inflamatória fetal (GOTSCH *et al.*, 2007; ROMERO *et al.*, 2016b). Seu aumento foi relacionado também à ocorrência de trabalho de parto e quando comparada com valores encontrados em adultos, observou-se que a IL-6 encontra-se aumentada no primeiro dia de vida em recém-nascidos a termo, achados que reforçam que o nascimento leva a um estresse que gera uma resposta inflamatória no recém-nascido (JOKIC *et al.*, 2000; SARANDAKOU *et al.*, 1998). Em estudo de recém-nascidos com sepse precoce, observou-se que o momento da coleta do sangue influencia os níveis plasmáticos de IL-6, sendo que há uma redução significativa do nível circulante desta citocina após 24 horas de vida (PROCIANOY; SILVEIRA, 2004).

2.1.4 IL-8

A IL-8 faz parte de uma família das citocinas chamadas de quimiocinas. As quimiocinas são responsáveis pela ativação de leucócitos e recrutamento destes ao local de inflamação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). Ela é produzida por leucócitos e diversas outras células como macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. Sua produção e consequente liberação são estimuladas por PAMP e também outras citocinas envolvidas no processo inflamatório, entre elas o TNF- α e IL-1 β (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

A IL-8 também é encontrada no líquido amniótico e no sangue de cordão umbilical (OTSUBO *et al.*, 2017; ROMERO *et al.*, 2016a; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). Em trabalho que analisou a produção de IL-8 em monócitos de cordão umbilical de recém-nascidos foi observado que estes apresentam porcentagem de células positivas para IL-8 maiores que adultos e ainda que, comparado com adultos e outros recém-nascidos pré-termo e a termo, os pré-termo com idade gestacional menor que 32 semanas com infecção comprovada são os que apresentam a maior porcentagem de monócitos positivos para IL-8 (SCHULTZ *et al.*, 2002, 2004).

2.1.5 IL-10

IL-10 é uma citocina de ação predominantemente anti-inflamatória envolvida na regulação da resposta imune. Ela é produzida por células imunes ativadas, como macrófagos e linfócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; SABAT *et al.*, 2010). Suas atuações envolvem a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, a modulação da ação de outros agentes inflamatórios e a estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias (BORISH, 1998; SABAT *et al.*, 2010). Apesar de uma ação predominantemente anti-inflamatória, a IL-10 também age estimulando a imunidade humoral e respostas imunes citotóxicas (BORISH, 1998). Sua liberação ocorre mais tardiamente na resposta inflamatória em comparação com outras citocinas e um dos principais estímulos para sua secreção é o TNF- α (BORISH, 1998).

A IL-10 pode ser encontrada em altos níveis no útero e placenta durante a gestação, agindo como uma reguladora dos processos inflamatórios; sabe-se também que sua produção placentária atua na prevenção da rejeição imune do feto (BLANCO-QUIRÓS *et al.*, 2000; SRINIVASAN; HARRIS; KILPATRICK, 2017). Estudo que avaliou a presença de IL-10 em sangue de cordão demonstrou que recém-nascidos pré-termo têm concentração maior desta citocina que recém-nascidos a termo, o que pode ser explicado pelo efeito imunossupressivo observado durante a gestação, que diminui quando esta aproxima-se do termo (BLANCO-QUIRÓS *et al.*, 2000). No entanto, quando avaliada a capacidade de produção de IL-10 em sangue de cordão de recém-nascidos em comparação com sangue de adultos, após estimulação *ex vivo*, foi observado que a produção é menor nos recém-nascidos e também que o efeito inibitório desta citocina sobre IL-6, IL-8 e TNF- α é menor nos recém-

nascidos que em adultos, o que pode explicar um estado inflamatório mais exacerbado nesta população, devido à dificuldade em modular a resposta inflamatória (SCHULTZ *et al.*, 2004).

2.1.6 TGF- β

O TGF- β engloba uma família de citocinas que podem ser subdivididas em TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Estas citocinas também têm função de regulação do sistema imune, com uma ação predominantemente anti-inflamatória. Células do sistema imune produzem predominantemente TGF- β 1, enquanto TGF- β 2 é encontrado mais abundantemente no leite materno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; LI *et al.*, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2015). Eles agem inibindo a ativação de macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, estimulando a produção de imunoglobulina A e também participando na reparação tecidual após o término da resposta imune e inflamatória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; LI *et al.*, 2006; OKAMURA *et al.*, 2015). Além de sua função imune, a família de TGF- β têm ação no desenvolvimento do embrião, no crescimento e diferenciação de células epiteliais, no processo de carcinogênese e no processo cicatrização e fibrose (LETTERIO; ROBERTS, 1998; LI *et al.*, 2006).

Liberado em sua forma latente, para iniciar sua ação, o TGF- β precisa ser ativado; *in vitro* esta ação pode ser realizada usando calor, pH extremo ou proteases; *in vivo* este processo é mais complexo e envolve diversos mecanismos, como necessidade de ativação proteolítica e interação com outras moléculas (LI *et al.*, 2006). Observação dos níveis de TGF- β em sangue de cordão demonstrou que TGF- β 1 é encontrado em níveis mais altos que TGF- β 2 ao nascimento (TAKAHASHI *et al.*, 2015). Níveis altos de TGF- β em sangue de cordão e também sua presença no leite materno sugerem um papel importante desta citocina no desenvolvimento fetal e na imunidade neonatal.

2.2 PREMATURIDADE

Idade gestacional é definida pelo tempo transcorrido desde o primeiro dia da última menstruação da mãe até o nascimento do recém-nascido. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), um nascimento é considerado prematuro quando ocorre em idade gestacional inferior a 37 semanas e a termo quando ocorre com idade gestacional igual ou superior a 37 semanas (WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.*, 2012). Diversas são as

causas e fatores de risco para a ocorrência de um parto prematuro, apesar de a maior parte dos partos prematuros não estarem relacionados a nenhum fator de risco claro. Fatores ambientais podem influenciar um parto prematuro, assim como fatores genéticos, imunológicos, inflamatórios e de estresse maternos (CAPPELLETTI *et al.*, 2016). Sabe-se que o nascimento prematuro têm associação com mortalidade e morbidade na infância e adolescência (ANCEL *et al.*, 2015; DE JESUS *et al.*, 2012; HARRISON; GOLDENBERG, 2016), mas sua repercussão estende-se também para a vida adulta, com um aumento no risco de mortalidade associado à prematuridade (CRUMP, 2019).

A prematuridade está relacionada a complicações a curto e longo prazo, sendo essas complicações inversamente relacionadas à idade gestacional. Pacientes nascidos pré-termo têm um tempo maior de internação hospitalar, necessitando muitas vezes de cuidados intensivos por tempo prolongado. Entre complicações a curto prazo, destacam-se as complicações respiratórias como doença da membrana hialina, maior necessidade de suporte respiratório e displasia broncopulmonar (DPB); enterocolite necrosante (ECN); maior incidência de sepse neonatal; e complicações neurológicas como hemorragia periventricular (HPIV), leucomalácia periventricular (LPV), crises convulsivas (PLATT, 2014). Entre complicações a longo prazo predominam as complicações neurológicas e pulmonares, como paralisia cerebral, atraso no neurodesenvolvimento, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade, maior incidência de autismo e pior função pulmonar (FAWKE *et al.*, 2010; FRANZ *et al.*, 2018; SAIGAL; DOYLE, 2008); porém também são importantes e de grande impacto o déficit visual, associado ou não a retinopatia da prematuridade (ROP) e o déficit auditivo (PLATT, 2014; VOGEL *et al.*, 2018).

2.3 O PROCESSO INFLAMATÓRIO NO RECÉM-NASCIDO PRÉ-TERMO

O parto é um momento relacionado com desencadeamento de reação inflamatória, tanto o parto do recém-nascido a termo quanto do pré-termo; porém, enquanto para o recém-nascido a termo este costuma ser um processo esperado para o nascimento, no recém-nascido pré-termo este processo ocorre da perda da homeostase que regula o período de quiescência uterina (CAPPELLETTI *et al.*, 2016; PELTIER, 2003; SARANDAKOU *et al.*, 1998; TUTDIBI *et al.*, 2012). Diversos estudos observaram reação inflamatória presente em tecido placentário, líquido amniótico e cérvix uterino no trabalho de parto, com algumas diferenças entre os nascimentos prematuros e a termo (BOWEN *et al.*, 2002; LIECHTY *et al.*, 1991;

MENDELSON, 2009). Fatores associados ao parto prematuro, como corioamnionite, infecção materna, ruptura prematura de membranas, trabalho de parto prematuro estão relacionados com alterações inflamatórias no recém-nascido e contribuem para uma reação inflamatória mais abundante e comorbidades no recém-nascido pré-termo (AGHAI *et al.*, 2012; CAPPELLETTI *et al.*, 2016; FICHOROVA *et al.*, 2015; PAANANEN *et al.*, 2009; ROMERO *et al.*, 2016b; SABIC; KOENIG, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2010). Muito discutiu-se sobre a capacidade do recém-nascido pré-termo de gerar uma reação inflamatória devido à sua imaturidade (CHANG *et al.*, 1994; FÖRSTER-WALDL *et al.*, 2005; LIECHTY *et al.*, 1991; STRUNK *et al.*, 2011); porém, apesar de possuir um sistema imune imaturo e de resultados discordantes sobre valores de citocinas nos recém-nascidos, sabe-se que o recém-nascido pré-termo tem capacidade para gerar uma reação inflamatória tão ou mais intensa que recém-nascidos a termo e adultos. A avaliação desta reação inflamatória na maioria dos estudos é realizada através de sangue de cordão umbilical em vez de sangue periférico, refletindo fortemente o que acontece no momento periparto.

Em estudo com sangue de cordão verificou-se que recém-nascidos pré-termo apresentavam níveis de IL-6 e IL-8 semelhantes ou maiores que recém-nascidos a termo e adultos e também eram capazes de liberar essas citocinas em quantidades significativas após estimulação e até em tempo mais rápido que adultos (SCHULTZ *et al.*, 2002). Por outro lado, observou-se também uma menor produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β após estimulação em monócitos de sangue de cordão de pré-termos comparados com recém-nascidos a termo e adultos (FÖRSTER-WALDL *et al.*, 2005; WISGRILL *et al.*, 2016). Estudos que avaliaram o nível sérico de diversas citocinas em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo e observaram que IL-6 e IL-8 diminuem quanto maior a idade gestacional, porém o inverso ocorre para TGF- β 1 e TGF- β 2 (TAKAHASHI *et al.*, 2010, 2015). Outros estudos que avaliaram sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo, observaram elevações em IL-8, IL-10, IL-1 β e TNF- α com menor idade gestacional; porém não encontrou-se associação entre idade gestacional e IL-6 e TGF- β (BLANCO-QUIRÓS *et al.*, 2000; DAMMANN *et al.*, 2001; MATOBA *et al.*, 2009). Dembinski e colaboradores (2003) avaliaram também a capacidade de produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 no sangue de cordão de recém-nascidos pré-termo menores de 32 semanas, maiores de 32 semanas e a termo após estimulação *ex vivo* e observaram menor produção de IL-6 nos pré-termo menores de 32 semanas em relação aos pré-termo maiores de 32 semanas e recém-nascidos a termo;

além disso, eles avaliaram também a cinética destas citocinas, tendo-as medido em diferentes tempos e encontraram o seguinte comportamento das citocinas:

- a) IL-1 β : produção significativa após 4h de incubação em todos os grupos, com platô entre 12-24h e reduzindo após;
- b) TNF- α : pico de produção após 8-12h de incubação, sem diferença entre os grupos, e com redução dos valores após as 12h;
- c) IL-6: aumento na produção após 4h de incubação, com pico entre 12-24h e um pequeno decréscimo após 48h;
- d) IL-8: platô observado entre 8-24h após incubação, mas com aumento contínuo nos valores até 48h;
- e) IL-10: produção significativa observada após 8h de incubação, com um aumento até atingir o platô em 24h.

Avaliação de valores de citocinas em recém-nascidos pré-termo e a termo após 5 dias de vida demonstrou que os recém-nascidos pré-termo mantêm um padrão inflamatório mais expressivo (SKOGSTRAND *et al.*, 2008), indicando uma persistência da resposta inflamatória, o que sugere uma produção neonatal de citocinas e corrobora a capacidade do recém-nascido pré-termo de produzir uma reação inflamatória significativa. Observou-se também que o processo inflamatório tem uma tendência a ser difuso nos recém-nascidos pré-termo extremos, com relação entre o aumento de uma citocina com aumento concomitante de outras citocinas (LEVITON *et al.*, 2012).

Estes resultados, por vezes contraditórios, sugerem que o recém-nascido pré-termo tem uma resposta inflamatória ainda imatura, favorecendo desbalanço na sua regulação, que pode estar associada aos desfechos da prematuridade. Relação entre níveis alterados de TNF- α , IL-8, IL-6, IL-10 e TGF- β 1 estão relacionados a manifestações pulmonares como desconforto respiratório precoce e displasia broncopulmonar (BOSE *et al.*, 2011; LEROY *et al.*, 2018; OTSUBO *et al.*, 2017; PAANANEN *et al.*, 2009; TAKAHASHI *et al.*, 2010, 2015). Valores elevados de IL-6, IL-8 e TNF- α foram associados com desenvolvimento de retinopatia da prematuridade (HELLGREN *et al.*, 2018; HOLM *et al.*, 2017; SILVEIRA; FORTES FILHO; PROCIANOY, 2011). Lesões neuronais no recém-nascido pré-termo têm associação com valores elevados de IL-6, IL-8 e TNF- α , enquanto que valores elevados de IL-10 e TGF- β parecem exercer efeito protetor (DAMMANN; O'SHEA, 2008; LEVITON *et al.*, 2011; PROCIANOY; SILVEIRA, 2012). Os marcadores inflamatórios relacionados a enterocolite necrosante tendem a aumentar próximo à ocorrência da doença, tendo sido

observadas elevações nos níveis de IL-8, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-1 β (GARG; SHARMA; BANSAL, 2018); no entanto, em um estudo foi possível observar uma redução nos níveis de TGF- β 1 ainda nos primeiros dias de vida nos recém-nascidos que desenvolveram enterocolite necrosante (MAHESHWARI *et al.*, 2014). O processo inflamatório no recém-nascido pré-termo encontra-se muitas vezes exacerbado já devido a acontecimentos intrauterinos e a uma reação desencadeada ainda no período fetal. Ao terem um sistema ainda imaturo, os recém-nascidos pré-termo têm maior dificuldade no controle desta reação inflamatória, sendo que em um feto que desenvolva uma síndrome da resposta inflamatória fetal a tendência é que, ao nascer, este recém-nascido apresente uma resposta inflamatória sistêmica neonatal. Essa imaturidade no controle da reação inflamatória é capaz de influenciar desfechos da prematuridade, por este motivo há tanto empenho na compreensão dos fatores envolvidos no desencadeamento da reação inflamatória e no comportamento das citocinas nestes recém-nascidos.

3 JUSTIFICATIVA

Espera-se que um feto nasça com idade gestacional maior que 37 semanas, momento a partir do qual é considerado a termo, sem comorbidades associadas; entretanto, o nascimento prematuro ocorre com frequência, com um ônus para a sociedade tanto em questões de custos assistenciais imediatos quanto em questões de comorbidades associadas à prematuridade (HARRISON; GOLDENBERG, 2016). Conforme a idade gestacional ao nascimento, este recém-nascido apresentará diferentes desafios para o seu manejo e um diferente prognóstico para sua vida futura.

Sabendo que o nascimento é um momento em que há uma ativação da cascata inflamatória no neonato, tanto por motivos fisiológicos quanto por motivos patológicos (CAPPELLETTI *et al.*, 2016; LYON *et al.*, 2010; PELTIER, 2003), diversos pesquisadores buscam compreender o comportamento dos marcadores inflamatórios nos recém-nascidos e sua associação com a normalidade ou com o desenvolvimento de patologias (AMBALAVANAN *et al.*, 2009; OTSUBO *et al.*, 2017; SKOGSTRAND *et al.*, 2008). Contudo, muitos são os estudos voltados para a prematuridade, sem o intuito de traçar uma comparação com aquilo que seria o esperado para o recém-nascido, isto é, um nascimento a termo, livre de comorbidades.

Muitas das patologias associadas ao recém-nascido pré-termo, como enterocolite necrosante, displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, hemorragia periventricular e leucomalácia periventricular têm sua etiologia associada a uma condição inflamatória exacerbada (MAHESHWARI *et al.*, 2014; OTSUBO *et al.*, 2017; TAKAHASHI *et al.*, 2010). Permanece, entretanto, a questão de em que momento esta condição inflamatória exacerbada precisa estar presente para o desenvolvimento destas doenças, se próximo à ocorrência da doença ou se uma condição apresentada ainda nos primeiros dias de vida é capaz de influenciar doenças que se desenvolvem mais tardiamente.

O presente estudo propõe-se a investigar a atividade inflamatória dos recém-nascidos nos primeiros dias de vida, através da aferição de citocinas pró e anti-inflamatórias em sangue periférico, trazendo informações adicionais à literatura, já que grande parte dos estudos publicados até o momento realizam coleta em sangue de cordão umbilical. Avaliando tanto recém-nascidos a termo quanto recém-nascidos pré-termo em diferentes idades gestacionais podemos traçar uma comparação entre aquilo que seria esperado para um recém-nascido em condições normais e aquilo que se encontra alterado, relacionando também com as doenças

mais frequentes da prematuridade associadas a questões inflamatórias. Estas análises e comparações são relevantes para uma melhor compreensão dos fatores relacionados à prematuridade, com um melhor manejo destes pacientes, objetivando uma redução nas comorbidades associadas à prematuridade e conseqüentemente melhora na morbimortalidade destes pacientes. Este estudo torna-se também importante quando observamos a escassez de publicações na literatura nacional a respeito deste assunto.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade inflamatória dos recém-nascidos a termo e pré-termo nas primeiras 72 horas de vida por meio das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6, IL-10, TGF- β 1 e TGF- β 2.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar a existência de diferenças entre a atividade inflamatória de recém-nascidos a termo e recém-nascidos pré-termo.
- b) Averiguar a associação entre a atividade inflamatória do recém-nascido nas primeiras 72 horas de vida com o desenvolvimento de displasia broncopulmonar.
- c) Investigar a associação da atividade inflamatória do recém-nascido nas primeiras 72 horas de vida com a ocorrência de retinopatia da prematuridade.
- d) Examinar a associação da atividade inflamatória do recém-nascido nas primeiras 72 horas de vida com enterocolite necrosante.
- e) Investigar a associação entre a atividade inflamatória do recém-nascido nas primeiras 72 horas de vida com hemorragia peri-intraventricular.
- f) Avaliar a associação da atividade inflamatória do recém-nascido nas primeiras 72 horas de vida com leucomalácia periventricular.
- g) Investigar a associação entre a atividade inflamatória do recém-nascido nas primeiras 72 horas de vida com a ocorrência de óbito

5 HIPÓTESES

A menor idade gestacional está associada a aumento da atividade inflamatória dos recém-nascidos nas primeiras 72 horas de vida. Uma atividade inflamatória aumentada nos primeiros dias de vida influencia desfechos desfavoráveis relacionados à prematuridade, como displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, enterocolite necrosante, hemorragia peri-intraventricular, leucomalácia periventricular e óbito.

6 MÉTODO

6.1 DELINEAMENTO

Estudo transversal seguido de uma coorte constituído de três grupos: Grupo 1 recém-nascidos pré-termo com idade gestacional menor que 28 semanas, Grupo 2 recém-nascidos pré-termo com idade gestacional maior ou igual a 28 semanas e menor que 33 semanas e Grupo 3 recém-nascidos a termo com idade gestacional maior ou igual a 38 semanas, isentos de comorbidades.

6.2 PARTICIPANTES

Foram selecionados para participar neste estudo recém-nascidos pré-termo com idade gestacional ao nascimento menor que 33 semanas e recém-nascidos a termo com idade gestacional maior ou igual a 38 semanas nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) internados na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) Neonatal e no Alojamento Conjunto desta instituição, respectivamente. Os participantes foram recrutados no período de 2014 a 2017, aleatoriamente.

6.2.1 Critérios de exclusão

6.2.1.1 Para todos os participantes

- a) Recém-nascidos admitidos na neonatologia provenientes de outro hospital;
- b) Presença de malformações congênicas ou síndromes genéticas;
- c) Recém-nascidos com suspeita de infecções congênicas;
- d) Recém-nascidos de mães portadoras do vírus HIV.

6.2.1.2 Critério adicional exclusivo para os recém-nascidos a termo

- a) Recém-nascidos com internação em Unidade Neonatal;
- b) Recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia e/ou corioamnionite.

6.3 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS

Para os recém-nascidos pré-termo com idade gestacional menor que 33 semanas, a família foi contatada para autorizar inclusão na pesquisa após o nascimento. Para os recém-nascidos a termo com idade gestacional maior ou igual a 38 semanas, a família foi contatada para autorizar inclusão na pesquisa após haver indicação de coleta de sangue pela equipe assistente. Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos responsáveis dos participantes foi obtido previamente à coleta dos dados de todos que aceitaram participar.

6.3.1 Variáveis laboratoriais

Quando indicado por motivos clínicos coleta de sangue dos pacientes participantes da pesquisa nas primeiras 72 horas de vida, volume adicional de 1ml foi coletado e armazenado em frasco contendo EDTA; as amostras foram coletadas preferencialmente na primeira indicação de coleta de sangue. A coleta de sangue foi realizada por médico assistente quando paciente portador de cateter arterial umbilical ou por coletador contratado do hospital quando realizada coleta de sangue periférico.

Após a coleta de sangue e armazenamento em frasco apropriado, o sangue foi centrifugado dentro de 30 minutos e separado o plasma, que foi armazenado em frascos de Eppendorf®. O frasco contendo plasma foi adequadamente identificado e congelado a -80°C para análise conjunta de todas as amostras. As amostras permaneceram armazenadas em *freezer* da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA.

Foram avaliadas em cada recém-nascidos as seguintes citocinas para identificação da atividade inflamatória presente nas primeiras 72 horas de vida: As citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6; e as citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF- β 1 e TGF- β 2.

6.3.2 Variáveis clínicas

Os dados clínicos dos pacientes e de suas progenitoras foram coletados durante o período de internação na Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal ou no Alojamento Conjunto e registrados em ficha de acompanhamento individual (Anexo A). Quando necessário, foi realizada uma revisão de prontuário.

As variáveis maternas e obstétricas foram registradas em prontuário materno, obtidas através da carteira de acompanhamento de pré-natal ou de acompanhamento realizado dentro do hospital de nascimento:

- a) Idade materna;
- b) Infecção de trato urinário no terceiro trimestre de gestação: determinada por urocultura positiva;
- c) Corioamnionite: diagnóstico por anatomopatológico (apenas avaliado para pacientes cujas placentas foram enviadas para anatomopatológico);
- d) Pré-eclâmpsia: diagnosticada por pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg em duas ou mais ocasiões após 20 semanas de gestação, associada a proteinúria maior que 300 mg em amostra de urina de 24 horas ou índice proteína/creatinina urinária maior que 0,3 mg/dL, em mulher sem diagnóstico prévio de hipertensão ou doença renal (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS AND OTHERS, 2019);
- e) Diabetes *mellitus* gestacional: definida por glicemia em jejum ≥ 92 mg/dL; ou após teste de sobrecarga oral com 75g de glicose com resultado de glicemia 1 hora após sobrecarga ≥ 180 mg/dL ou Glicemia 2 horas após sobrecarga ≥ 153 mg/dL (OLIVEIRA; VENCIO, 2017);
- f) Uso de corticóide antenatal.

As variáveis do nascimento são registradas em ficha de atendimento de sala de parto e definidas pelo pediatra atendente no momento do parto:

- a) Idade gestacional: avaliada pela data da última menstruação confiável ou ultrassom obstétrico precoce (realizado nas primeiras 12 semanas da gestação); na ausência de uma destas informações, determinada pelo exame clínico neonatal através do método de New Ballard ou Capurro (BALLARD *et al.*, 1991; CAPURRO *et al.*, 1978);
- b) Peso de nascimento: aferido em balança eletrônica devidamente calibrada, em todos os recém-nascidos, no centro obstétrico, no momento do nascimento;
- c) Classificação quanto ao peso e idade gestacional: recém-nascidos classificados em Pequeno para Idade Gestacional (PIG), Adequado para Idade Gestacional (AIG), ou Grande para Idade Gestacional (GIG), conforme a classificação de Alexander (ALEXANDER *et al.*, 1996);
- d) Sexo biológico;

- e) Tipo de parto: classificado em parto vaginal ou cesáreo;
- f) Escore de Apgar: verificado no 1º e 5º minutos de vida, conforme classificação de Apgar (APGAR, 1952);
- g) Tempo de bolsa rota.

As variáveis do recém-nascido foram avaliadas pelo acompanhamento do recém-nascido durante período de internação ou revisão de prontuário, quando necessário.

- a) Retinopatia da prematuridade: avaliada e classificada por oftalmologista experiente através de avaliação realizada rotineiramente em todos os recém-nascidos pré-termo após a quarta semana de vida;
- b) Displasia broncopulmonar: definida pelo uso de oxigênio suplementar por período igual ou superior a 28 dias de vida (JOBE; BANCALARI, 2001);
- c) Entecorolite necrosante: definida conforme os critérios de Bell, modificados posteriormente por Walsh e Kleigman, a partir do estágio II, conforme protocolo do serviço (BELL *et al.*, 1978; WALSH; KLIEGMAN, 1986);
- d) Hemorragia peri-intraventricular grau 2 ou maior: diagnosticada por ecografias cerebrais seriadas por operador experiente, usada classificação de Papile (PAPILE *et al.*, 1978);
- e) Leucomalácia periventricular: diagnosticada através de ecografia cerebral e ressonância nuclear magnética, realizadas por radiologista experiente;
- f) Alta ou óbito: desfechos determinantes do término de acompanhamento do paciente.

6.4 CÁLCULO DO TAMANHO DE AMOSTRA

Para cálculo de tamanho de amostra, utilizou-se o *software* G*Power 3.1.9.4® (FAUL *et al.*, 2007) desenvolvido para ciências sociais e biomédicas com base no poder estatístico ($1-\beta$) e no erro aceitável (α) para cálculo de Análises de Variância (ANOVA) com três grupos e uma variável independente (i.e., idade gestacional). Foi definido um erro de 0.05, selecionado um poder estatístico de 0.90, e o tamanho do efeito da ANOVA foi utilizado com base no η_p^2 de 0.13, segundo recomendações de tamanho de efeito “grande” para tamanho de efeito da ANOVA (COHEN, 1988). Obteve-se um tamanho de amostra total de 97 participantes (i.e., cerca de 33 por grupo). Optou-se por coletar em torno de 20% a mais de participantes devido à possibilidade de perdas.

6.5 PROCEDIMENTOS DE ANÁLISE DE DADOS

6.5.1 Análise das Variáveis Laboratoriais

As análises laboratoriais das citocinas plasmáticas IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6, IL-10 foram realizadas usando o *kit* HCYTOMAG-60K-05-MILLIPLEX MAP HUMAN CYTOKINE/CHEMOKINE MAGNETIC BEAD PANEL-05 PLEX® (marca Merck-Millipore). Este é um ensaio de multiplex para a determinação quantitativa simultânea de citocinas, com uma precisão intra e inter ensaios variando de 1,6 a 18,3%. As análises laboratoriais dos fatores de transformação de crescimento β 1 e β 2 foram realizadas usando o *kit* disponível comercialmente TGFBMAG-64K-03-MILLIPLEX MAP TGF β MAGNETIC BEAD 3 PLEX KIT® (marca Merck-Millipore). Este é um ensaio de multiplex para a determinação quantitativa simultânea desses fatores de crescimento, com uma precisão intra e inter ensaios de 4,6 a 7,0% para TGF- β 1 e TGF- β 2. As leituras dos *kits* HCYTOMAG-60K-05® para os grupos de recém-nascidos pré-termo e dos *kits* TGFBMAG-64K-03® para os todos os participantes foram realizadas no aparelho Luminex 200® (Austin, Texas) e analisadas com *software* xPONENT®. A leitura do *kit* HCYTOMAG-60K-05® para os recém-nascidos a termo foi realizada no aparelho MAGPIX® e analisada com *software* Milliplex Analyte V.5.1 Flex®. Todas as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 3.000 rotações por minuto (RPM) pela equipe de pesquisa antes do ensaio a fim de obter 300mcL de plasma. As amostras foram analisadas em duplicata, seguindo as orientações do fabricante.

O princípio da técnica é o de uma reação tipo antígeno-anticorpo, de forma semelhante ao método de ELISA convencional. A diferença reside no fato de que o *kit* Luminex contém microesferas marcadas com diferentes fluorescências intrínsecas e cobertas com os anticorpos de captura desejados que após a mistura com os reagentes apropriados para cada *kit* irão reagir com os antígenos específicos na amostra. A leitura ocorre pelo espectro de emissão de luz a partir de cada reação que cada diferente analito promoverá. Cada anticorpo imobilizado dentro dos espaços da placa emite luz em determinado comprimento de onda e o leitor do aparelho promove a leitura, neste caso, em diferentes comprimentos de onda correspondente a cada um dos analitos disponíveis na análise. Fez-se necessário o uso de dois *kits* multiplex, um contendo cinco citocinas para análise: IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β e TNF- α e o segundo contendo TGF- β 1 e TGF- β 2. Os aparelhos e *softwares* utilizados para leitura e análise dos *kits*

seguiram a recomendação do fabricante, tendo sido devidamente calibrados e ajustados para os procedimentos.

Cada *kit* é composto por uma placa para análise, reagentes, analitos e *beads* magnéticas, necessários para o processamento das amostras. Para cada análise é realizada uma curva padrão e dois controles de qualidade para verificação e qualificação dos resultados. As amostras, curva padrão e controles foram analisados em duplicatas e o coeficiente de variabilidade foi avaliado para cada citocina de cada amostra. Os resultados emitidos após a leitura da placa foram analisados para validação dos resultados. Foi observada a adequação da curva padrão conforme os *standards*; uma contagem mínima de 50 *beads* por poço era necessária para o resultado. Foram também avaliados os coeficientes de variabilidade da duplicata, sendo que um coeficiente menor que 15% foi considerado adequado e foi observado para que menos que 20% das duplicatas tivessem um coeficiente maior que 25%. Amostras com coeficiente de variabilidade maior que 20% foram sinalizadas para avaliação e possível exclusão. Cada citocina tem um nível mínimo de detecção específico conforme o *kit*, especificado a seguir para cada uma: TNF- α 0,7pg/mL; IL-1 β 0,8pg/mL; IL-6 0,9pg/mL; IL-8 0,4pg/mL; IL-10 1,1pg/mL; TGF- β 1 6,0pg/mL; TGF- β 2 6,6pg/mL. Devido ao fato de a maioria dos resultados de IL-1 β encontrarem-se abaixo deste nível de detecção, optou-se por excluir esta citocina das análises.

6.5.2 Análise estatística

Análises descritivas para todas as características dos pacientes foram calculadas. Comparações a respeito das diferenças entre os grupos de recém-nascidos foram feitas com base no teste de Kruskal-Wallis para variáveis contínuas e Qui-Quadrado de Pearson para variáveis categóricas. Para cada uma das hipóteses de trabalho, foram utilizados métodos estatísticos específicos. Em função da amostra não seguir uma distribuição normal, os dados das citocinas foram normalizados para todas as análises por meio de uma transformação utilizando escore padrão (escore z). Utilizou-se *software* estatístico IBM SPSS Statistics®, versão 21 (IBM CORP., 2012), para análises.

Para investigar a primeira hipótese que a idade gestacional influencia a atividade inflamatória dos recém-nascidos nas primeiras 72 horas de vida, utilizou-se Análises de Variância (ANOVA) Univariadas com idade gestacional em três grupos como variável independente, sendo eles (1) pré-termo com idade gestacional menor que 28 semanas, (2) pré-

termo com idade gestacional maior ou igual a 28 semanas e menor que 33 semanas, e (3) termos nascidos com idade gestacional maior ou igual a 38 semanas. As variáveis dependentes foram as três citocinas pró-inflamatórias Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-8 (IL-8), Interleucina-6 (IL-6); e as três citocinas anti-inflamatórias Interleucina-10 (IL-10) e os fatores de transformação de crescimento β 1 e β 2 (TGF- β 1, TGF- β 2). Como medida de controle adicional, foram realizadas Análises de Covariância (ANCOVA) para cada uma dessas análises em função das características maternas pré-eclâmpsia e corioamnionite. Foi usado um fator de correção de Bonferroni para comparações planejadas e todos os tratamentos estatísticos utilizaram um nível de significância α de 0.05 para testes de hipóteses.

Para avaliar a segunda hipótese que as citocinas influenciam os desfechos desfavoráveis associados com os recém-nascidos, utilizou-se inicialmente uma análise de correlação bivariada de Pearson para identificar o fator preditor de cada citocina nos desfechos clínicos. Na sequência, todas as citocinas foram confrontadas (como variáveis independentes) em Análises de Regressão Logística para cada desfecho clínico dos pacientes como variável dependente. *Odds Ratios* foram estimados com 95% de intervalo de confiança para cada variável. Os desfechos avaliados foram DBP, ROP, ECN, HPIV, LPV e óbito.

6.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Conforme a Resolução CNS 466/2012, que estabelece as diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisa com seres humanos, o projeto de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido foram submetidos para avaliação à Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA e foram aprovados (CAAE no. 66183617.3.0000.5327).

Para este estudo, foram utilizados dados clínicos e laboratoriais dos pacientes e suas mães, registrados em ficha de acompanhamento individual e transcritos para formulário padronizado (Anexo A), identificado por código numérico, preservando o anonimato de cada indivíduo.

Visando o menor número de intervenções possíveis, os recém-nascidos não foram submetidos a procedimentos exclusivamente para a pesquisa. A coleta de sangue foi realizada quando havia indicação clínica pela equipe assistente; ao volume desta foi acrescido um volume adicional mínimo para fins da pesquisa, constituindo em menos de 2% da volemia,

traduzindo-se em um risco ínfimo para o recém-nascido. Estas informações constam no termo de consentimento informado, livre e esclarecido (Anexo B e Anexo C).

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 9. ed. [S. l.]: Elsevier, 2017. *E-book*.

AGHAI, Z. H. *et al.* Impact of histological chorioamnionitis on tracheal aspirate cytokines in premature infants. **American Journal of Perinatology**, [S. l.], v. 29, n. 07, p. 567–572, 2012.

ALEXANDER, G. *et al.* A United States national reference for fetal growth. **Obstetrics & Gynecology**, [S. l.], v. 87, n. 2, p. 163–168, 1996.

AMBALAVANAN, N. *et al.* Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. **Pediatrics**, [S. l.], v. 123, n. 4, p. 1132–1141, 2009.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS AND OTHERS. ACOG practice bulletin No. 202: Gestational hypertension and preeclampsia. **Obstetrics & Gynecology**, [S. l.], v. 133, p. e1–e25, 2019.

ANCEL, P.-Y. *et al.* Survival and morbidity of preterm children born at 22 through 34 weeks' gestation in France in 2011: results of the EPIPAGE-2 cohort study. **JAMA Pediatrics**, [S. l.], v. 169, n. 3, p. 230–238, 2015.

ANDERSON, M. R.; BLUMER, J. L. Advances in the therapy for sepsis in children. **Pediatric Clinics of North America**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 179–205, 1997.

BALLARD, J. L. *et al.* New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 119, n. 3, p. 417–423, 1991.

BELL, M. J. *et al.* Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. **Annals of Surgery**, [S. l.], v. 187, n. 1, p. 1, 1978.

BLANCO-QUIRÓS, A. *et al.* Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. **European Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 159, n. 6, p. 420–423, 2000.

BORISH, L. IL-10: evolving concepts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], v. 101, n. 3, p. 293–297, 1998.

BOSE, C. *et al.* Blood protein concentrations in the first two postnatal weeks that predict bronchopulmonary dysplasia among infants born before the 28th week of gestation. **Pediatric Research**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 347–353, 2011.

BOWEN, J. M. *et al.* Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. **Placenta**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 257–273,

2002.

CAPPELLETTI, M. *et al.* Inflammation and preterm birth. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 99, n. 1, p. 67–78, 2016.

CAPURRO, H. *et al.* A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 93, n. 1, p. 120–122, 1978.

CHANG, M. *et al.* Transforming growth factor-beta 1, macrophage inflammatory protein-1 alpha, and interleukin-8 gene expression is lower in stimulated human neonatal compared with adult mononuclear cells. **Blood**, [S. l.], v. 84, p. 118–124, 1994.

CHAWANPAIBOON, S. *et al.* Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. **The Lancet. Global Health**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. e37–e46, 2019.

CRUMP, C. Preterm birth and mortality in adulthood: a systematic review. **Journal of Perinatology**, [S. l.], p. 1–11, 2019.

DAMMANN, O. *et al.* Mediators of fetal inflammation in extremely low gestational age newborns. **Cytokine**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 234–239, 2001.

DAMMANN, O.; O'SHEA, T. M. Cytokines and perinatal brain damage. **Clinics in Perinatology**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 643–663, 2008.

DE JESUS, L. C. *et al.* Risk factors for post-neonatal intensive care unit discharge mortality among extremely low birth weight infants. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 161, n. 1, p. 70–74, 2012.

DEMBINSKI, J. *et al.* Modulation of pro-and anti-inflammatory cytokine production in very preterm infants. **Cytokine**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 200–206, 2003.

FAUL, F. *et al.* G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 175–191, 2007.

FAWKE, J. *et al.* Lung function and respiratory symptoms at 11 years in children born extremely preterm: the EPICure study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 182, n. 2, p. 237–245, 2010.

FICHOROVA, R. N. *et al.* Systemic inflammation in the extremely low gestational age newborn following maternal genitourinary infections. **American Journal of Reproductive Immunology**, [S. l.], v. 73, n. 2, p. 162–174, 2015.

FÖRSTER-WALDL, E. *et al.* Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. **Pediatric Research**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 121, 2005.

FRANZ, A. P. *et al.* Attention-deficit/hyperactivity disorder and very preterm/very low birth weight: a meta-analysis. **Pediatrics**, [S. l.], v. 141, n. 1, p. e20171645, 2018.

GARG, B. D.; SHARMA, D.; BANSAL, A. Biomarkers of necrotizing enterocolitis: a review of literature. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, [S. l.], v. 31, n. 22, p. 3051–3064, 2018.

GOTSCH, F. *et al.* The fetal inflammatory response syndrome. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 652–683, 2007.

HARRISON, M. S.; GOLDENBERG, R. L. Global burden of prematurity. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 74–79, 2016.

HELLGREN, G. *et al.* Increased postnatal concentrations of pro-inflammatory cytokines are associated with reduced IGF-I levels and retinopathy of prematurity. **Growth Hormone & IGF Research**, [S. l.], v. 39, p. 19–24, 2018.

HOLM, M. *et al.* Systemic inflammation-associated proteins and retinopathy of prematurity in infants born before the 28th week of gestation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [S. l.], v. 58, n. 14, p. 6419–6428, 2017.

JOBE, A. H.; BANCALARI, E. Bronchopulmonary dysplasia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 163, n. 7, p. 1723–1729, 2001.

JOKIC, M. *et al.* Fetal distress increases interleukin-6 and interleukin-8 and decreases tumour necrosis factor-alpha cord blood levels in noninfected full-term neonates. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [S. l.], v. 107, n. 3, p. 420–425, 2000.

LEAL, M. do C. *et al.* Prevalence and risk factors related to preterm birth in Brazil. **Reproductive Health**, [S. l.], v. 13, n. Suppl 3, p. 127, 2016.

LEROY, S. *et al.* A time-based analysis of inflammation in infants at risk of bronchopulmonary dysplasia. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 192, p. 60- 65.e1, 2018.

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF- β . **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 137–161, 1998.

LEVITON, A. *et al.* The relationship between early concentrations of 25 blood proteins and cerebral white matter injury in preterm newborns: the ELGAN study. **The Journal of**

Pediatrics, [S. l.], v. 158, n. 6, p. 897–903, 2011.

LEVITON, A. *et al.* Relationships among the concentrations of 25 inflammation-associated proteins during the first postnatal weeks in the blood of infants born before the 28th week of gestation. **Cytokine**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 182–190, 2012.

LI, M. O. *et al.* Transforming growth factor- β regulation of immune responses. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 24, p. 99–146, 2006.

LIECHTY, K. W. *et al.* Production of interleukin-6 by fetal and maternal cells in vivo during intraamniotic infection and in vitro after stimulation with interleukin-1. **Pediatric Research**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 1, 1991.

LYON, D. *et al.* Integrated review of cytokines in maternal, cord, and newborn blood: part I--associations with preterm birth. **Biological Research for Nursing**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 371–376, 2010.

MAHESHWARI, A. *et al.* Cytokines associated with necrotizing enterocolitis in extremely-low-birth-weight infants. **Pediatric Research**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 100, 2014.

MALAMITSI-PUCHNER, A. *et al.* The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. **Early Human Development**, [S. l.], v. 81, n. 4, p. 387–392, 2005.

MATOBA, N. *et al.* Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. **Pediatrics**, [S. l.], v. 123, n. 5, p. 1320–1328, 2009.

MENDELSON, C. R. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. **Molecular Endocrinology**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 947–954, 2009.

NESIN, M.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S. Cytokines and neonates. **American Journal of Perinatology**, [S. l.], v. 17, n. 08, p. 393–404, 2000.

OKAMURA, T. *et al.* Role of TGF- β 3 in the regulation of immune responses. **Clinical and Experimental Rheumatology**, [S. l.], v. 33, n. 4 Suppl 92, p. 63–69, 2015.

OLIVEIRA, J. E. P.; VENCIO, S. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. São Paulo: Editora Clannad, p. 91, 2017.

OPSHJØN, S.-L. *et al.* Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 169, n. 2, p. 397–404, 1993.

OTSUBO, Y. *et al.* Association of cord blood chemokines and other biomarkers with neonatal

complications following intrauterine inflammation. **PloS One**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. e0175082, 2017.

PAANANEN, R. *et al.* Blood cytokines during the perinatal period in very preterm infants: relationship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 154, n. 1, p. 39–43, 2009.

PAPILE, L. A. *et al.* Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: A study of infants with birth weights less than 1,500 gm. **The Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 92, n. 4, p. 529–534, 1978.

PELTIER, M. R. Immunology of term and preterm labor. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 122, 2003.

PLATT, M. J. Outcomes in preterm infants. **Public Health**, [S. l.], v. 128, n. 5, p. 399–403, 2014.

PROCIANOY, R. S.; SILVEIRA, R. C. The role of sample collection timing on interleukin-6 levels in early-onset neonatal sepsis. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 5, p. 407–410, 2004.

PROCIANOY, R. S.; SILVEIRA, R. C. Association between high cytokine levels with white matter injury in preterm infants with sepsis. **Pediatric Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 183–187, 2012.

PROTONOTARIOU, E. *et al.* Patterns of inflammatory cytokine serum concentrations during the perinatal period. **Early Human Development**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 31–38, 1999.

ROMERO, R. *et al.* Clinical chorioamnionitis at term V: umbilical cord plasma cytokine profile in the context of a systemic maternal inflammatory response. **Journal of Perinatal Medicine**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 53–76, 2015.

ROMERO, R. *et al.* Clinical chorioamnionitis at term II: the intra-amniotic inflammatory response. **Journal of perinatal Medicine**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 5–22, 2016.

SABAT, R. *et al.* Biology of interleukin-10. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 331–344, 2010.

SABIC, D.; KOENIG, J. M. A perfect storm: fetal inflammation and the developing immune system. **Pediatric Research**, [S. l.], v. 87, n. 2, p. 319–326, 2020.

SAIGAL, S.; DOYLE, L. W. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. **The Lancet**, [S. l.], v. 371, n. 9608, p. 261–269, 2008.

SARANDAKOU, A. *et al.* Inflammatory cytokines in newborn infants. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 309–312, 1998.

SCHULTZ, C. *et al.* Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. **Pediatric Research**, [S. l.], v. 51, n. 3, p. 317, 2002.

SCHULTZ, C. *et al.* Immature anti-inflammatory response in neonates. **Clinical & Experimental Immunology**, [S. l.], v. 135, n. 1, p. 130–136, 2004.

SILVEIRA, R. C.; FORTES FILHO, J. B.; PROCIANOY, R. S. Assessment of the contribution of cytokine plasma levels to detect retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 1297–1301, 2011.

SKOGSTRAND, K. *et al.* Association of preterm birth with sustained postnatal inflammatory response. **Obstetrics & Gynecology**, [S. l.], v. 111, n. 5, p. 1118–1128, 2008.

SRINIVASAN, L.; HARRIS, M. C.; KILPATRICK, L. E. Cytokines and inflammatory response in the fetus and neonate. In: POLIN, R. A. *et al.* (org.). **Fetal and neonatal physiology**. 5th ed. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 1241-1254.e4. *E-book*.

STRUNK, T. *et al.* Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 25–31, 2011.

TAKAHASHI, N. *et al.* Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. **Cytokine**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 331–337, 2010.

TAKAHASHI, N. *et al.* Constitutively high-level expression of TGF- β isoforms in cord blood and its relationship to perinatal findings. **Cytokine**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 101–107, 2015.

TUTDIBI, E. *et al.* Levels of cytokines in umbilical cord blood in relation to spontaneous term labor. **Journal of Perinatal Medicine**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 527–532, 2012.

VOGEL, J. P. *et al.* The global epidemiology of preterm birth. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [S. l.], v. 52, p. 3–12, 2018.

WALSH, M. C.; KLIEGMAN, R. M. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. **Pediatric Clinics of North America**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 179–201, 1986.

WISGRILL, L. *et al.* Reduced TNF- α response in preterm neonates is associated with impaired nonclassic monocyte function. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 100, n. 3, p. 607–612, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Born too soon: the global action report on preterm birth.** Geneva: World Health Organization, 2012. *E-book*.

ZHOU, X. *et al.* Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic care**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 541, 2010.

8 ARTIGO

The inflammatory activity of infants in the first 72 hours of life according to gestational age and outcomes associated with prematurity

Laura G B Rieck MD MSc, Renato S Procianoy MD PhD, Rita C Silveira MD PhD

Abstract

Background

Perinatal inflammation has been associated with prematurity and its outcomes; however, differences between inflammatory activity of term and preterm infants is not fully understood. We hypothesize that preterm infants have exacerbated inflammatory activity early in life, influencing prematurity outcomes.

Methods

Levels of seven cytokines were assessed (IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6, IL-10, TGF- β 1 and TGF- β 2) through immunoassay. A total of 103 infants in the first 72 hours of life participated in this study. They were divided into three groups, according to gestational age (<28 weeks, 28-33 weeks, and \geq 38 weeks). Levels of these cytokines were related with BPD, ROP, NEC, IVH, PVL, death.

Results

TNF- α , IL-8, IL-6 and TGF- β 1 and TGF- β 2 presented differences between term and preterm infants. When controlling for preeclampsia and chorioamnionitis, TNF- α and TGF- β 1 were superior in full-term infants, while IL-8 was superior in extremely premature infants. IL-

8 increased the chances of developing BPD by 6 times and TGF- β 1 reduced this chance by 0.03 times; IL-6 increased the chance of developing ROP by 16 times.

Conclusion

There are significant differences between the inflammatory activity of term and preterm infants in the first days of life, which are related to the clinical outcomes associated with prematurity.

Introduction

It is estimated that around 11% of infants are born preterm each year, a condition highly associated with great morbidity and mortality (1–4). Several studies have associated outcomes of prematurity, such as bronchopulmonary dysplasia (BDP), retinopathy of prematurity (ROP), intraventricular hemorrhage (IVH), periventricular leukomalacia (PVL), and necrotizing enterocolitis (NEC), with an exacerbated inflammatory condition in these patients (5–13).

The inflammatory process can be measured by evaluating pro- and anti-inflammatory cytokines, which can be assessed in amniotic fluid, tracheal aspirate, cord blood or peripheral blood (14–18). Among the pro-inflammatory cytokines, it is possible to highlight Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) and Interleukin-8 (IL-8), cytokines related to the birth process and that increase rapidly in response to injuries (18–22). Among the anti-inflammatory cytokines, Interleukin-10 (IL-10) and the family of Transforming Growth Factor- β (TGF- β 1 and TGF- β 2) act in the control of the inflammatory response, in addition to being related to fetal development (23–26).

During birth, there is an activation of the neonate's inflammatory cascade, both for physiological and pathological reasons (20,21,27). Most studies focus on the evaluation of umbilical cord blood and not peripheral blood (11,18,28), predominantly reflecting this moment of birth, which can also be influenced by maternal conditions, such as urinary tract infection, chorioamnionitis, premature rupture of the membrane, preeclampsia or placental abruption (29,30).

In this study, we propose to assess the inflammatory activity of term and preterm infants in the first 72 hours of life, with the hypothesis that a lower gestational age is associated with an increase in inflammatory activity and that this increase so early in life influences subsequent outcomes associated with prematurity.

Methods

Participants

Infants born in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), admitted to the neonatal Intensive Care Unit (ICU) or rooming-in of this hospital, divided into three groups according to gestational age: Group 1 (preterm infants with a gestational age of less than 28 weeks), Group 2 (preterm infants with a gestational age greater than or equal to 28 weeks and less than 33 weeks), and Group 3 (full-term infants with a gestational age greater than or equal to 38 weeks). Group 3 participants were selected from healthy pregnancies without maternal or neonatal morbidity that could confuse assessment.

Infants with congenital malformations or genetic syndromes, suspicion of congenital infections, or whose mothers had HIV were excluded. Concerning full-term newborns, those who had to be admitted to the Neonatal Unit or whose mothers had chorioamnionitis or preeclampsia were excluded. Informed consent forms were given to the legal guardians for inclusion in the study. The study protocol was approved by the HCPA Ethics Committee.

Maternal and Perinatal Data Collection

Maternal data were collected and prospectively recorded on the infant's follow-up form. The maternal variables evaluated were: maternal age; urinary tract infection in the third trimester of pregnancy, with positive urine culture; the presence of histological chorioamnionitis; preeclampsia; gestational diabetes mellitus; use of antenatal corticosteroids.

Birth data were collected from the delivery room records and the variables analyzed were: gestational age, defined by the date of the last reliable menstruation or obstetric ultrasound before 12 weeks of gestation and, in the absence of these pieces of information, by the neonatal clinical examination using the New Ballard or Capurro methods (31,32); duration of rupture of membranes; mode of delivery; sex; Apgar score in the first and fifth minutes of

life (33); birth weight; weight adequacy in relation to gestational age, according to Alexander's classification as Adequate, Small or Large for gestational age (34).

Neonatal Data Collection

Neonatal data were collected prospectively during the infants' follow-up while hospitalized or through the review of medical records. The following outcomes were included in the analyses and defined as follows: ROP, defined as treatable ROP stage 2 or 3 categorized according to the International Classification of Retinopathy of Prematurity and always corresponding to the highest stage of ROP found in any of the eyes during patient follow-up (35); BPD, use of supplemental oxygen for a period equal to or greater than 28 days of life (36); NEC, according to Bell's criteria, later modified by Walsh and Kleigman, from stage II, according to the service's protocol (37,38); IVH, according to transfontanellar ultrasound and Papile's classification (39); PVL, diagnosed using cranial ultrasound and nuclear magnetic resonance, performed by an experienced radiologist; death.

Laboratory Data Collection and Analysis

Blood samples were collected in the first 72 hours of life with an additional volume for the sample required by the health care team, not having a collection solely for this research. The sample was stored in an appropriate vial and the blood was centrifuged within 30 minutes after collection for 5 minutes at 3000 revolutions per minute (RPM). The plasma was separated and frozen at -80°C . The samples were analyzed by immunoassay using multiplex kits. To analyze the desired cytokines, it was necessary to use two multiplex kits, one containing five cytokines for analyses: IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β and TNF- α , HCYTOMAG-60K-05-MILLIPLEX MAP HUMAN CYTOKINE/CHEMOKINE MAGNETIC BEAD PANEL - 05 PLEX $^{\circledR}$ (brand Merck-Millipore), with intra-and inter-assay precision ranging from 1.6 to 18.3%; and the second one containing TGF- β 1 and TGF- β 2, TGFBMAG-64K-03-MILLIPLEX MAP TGF β MAGNETIC BEAD 3 PLEX KIT $^{\circledR}$ (brand Merck-Millipore), with

intra-and inter-assay precision ranging from 4.6% to 7.0%. Analyses were performed in Luminex 200® System (Austin, Texas) with xPONENT® software or with the MAGPIX®, using the Milliplex® Analyst V.5.1 Flex software. The samples were analyzed in duplicate and the coefficient of variability was evaluated for each situation; a coefficient less than 15% was considered adequate. Each cytokine has a specific lower limit of detection, ranging from 0.4 to 6.6 pg/mL. Since the majority of IL-1 β results were below this level of detection, it was decided to exclude this cytokine from the analyses.

Statistical Analysis

Kruskal-Wallis tests were used for continuous variables and Pearson's chi-square tests for categorical variables. Specific statistical methods were used for each hypothesis of the study. As the sample did not follow a normal distribution, the cytokine data were normalized for all analyses using a standard z score transformation. All analyses were performed using the statistical software IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM, Armonk, NY).

Univariate Analysis of Variance (ANOVA) was used to determine the influence of gestational age (based on the three groups) in each of the cytokines. As an additional control measure, Covariance Analysis (ANCOVA) was performed for each cytokine according to maternal characteristics preeclampsia and chorioamnionitis. Bonferroni correction factor was used for planned comparisons and all statistical treatments used an α significance level of 0.05 for hypothesis testing.

Pearson's bivariate correlation analysis was used to identify the relationship between the level of each cytokine and the clinical outcomes. Subsequently, a Logistic Regression Analysis was performed for each clinical outcome using the cytokines as predictive factors. Odds ratio with a 95% confidence interval was estimated for each variable.

Results

A total of 103 participants were included in the study. They were divided into three groups: Group 1, with 29 participants; Group 2, with 37 participants; and Group 3, with 37 participants.

Table 1 shows a comparison between the maternal, perinatal and neonatal characteristics of the three groups. Table 2 presents the clinical outcomes of preterm patients (Groups 1 and 2), with a greater prevalence of BPD and ROP in Group 1. When comparing Groups 1 and 2 with Group 3, it is possible to observe a higher occurrence of BPD, ROP and IVH for Group 1 in relation to Group 3 and a higher occurrence of BPD, ECN and PVL for Group 2 in relation to Group 3.

Comparison between gestational age and cytokine levels

The levels of TNF- α were higher in Groups 1 and 3 in relation to Group 2 and IL-8 and IL-6 were higher in Group 1 in relation to the other two groups. We observed higher levels of IL-10 for Group 2 in comparison to Group 1 and higher levels of TGF- β 1 and TGF- β 2 for Group 3 in relation to Groups 1 and 2 (Table 3). When controlling for the presence of preeclampsia and chorioamnionitis, only the results for TNF- α , IL-8, and TGF- β 1 remained significant. Plasma levels of TNF- α were higher in Group 3 compared to the other two groups ($p < 0.01$), whereas TGF- β 1 levels remained higher in Group 3 only in relation to Group 1 ($p < 0.05$). For IL-8 levels, only the difference between infants in Group 1 and infants in Group 2 is maintained ($p < 0.05$). For this cytokine, a main effect of preeclampsia is observed, and this result is qualified by the correlation that suggests an inverse relationship between the presence of preeclampsia and IL-8 levels, $r(103) = -0.45$, $p < 0.001$.

Cytokines as predictors of clinical outcomes

The relationship between the levels of each cytokine and the clinical outcomes can be found in Table 4. We found that the higher the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-8

and IL-6, the greater the chance of patients developing BPD and ROP, respectively; elevated levels of IL-8 also predict a greater chance of ECN and IVH. The anti-inflammatory cytokine IL-10 at increased levels was associated with a higher occurrence of BPD and ROP. For the other anti-inflammatory cytokines, higher levels of TGF- β 1 are associated with lower levels of BPD, ROP, and IVH and higher levels of TGF- β 2 predict less chance of developing BPD.

To identify the probability of a single prediction of cytokines when controlling for the presence of the others, a logistic regression analysis was performed for each clinical outcome. The two outcomes whose models were significant (BPD and ROP) are shown in Table 5. For BPD, the model was significant with $\chi^2 = 45.98$, $p < 0.001$, explaining between 37.40% (Cox and Snell's R^2) and 51.9% (Nagelkerke's R^2) of the variance of the development of this comorbidity. In this model, for the increase of one unit in the levels of IL-8 the chance of developing BPD increases by 6.1 times and for the increase of one unit in the levels of TGF- β 1 the chance of developing BPD decreases by 0.03 times. For ROP, the model was significant with $\chi^2 = 29.94$, $p < 0.001$, explaining between 27.3% (Cox and Snell's R^2) and 43.8% (Nagelkerke's R^2) of the variance of the development of these comorbidities. In this model, for the increase of one unit in the levels of IL-6, there is a 16.23-fold increase in the chance of developing ROP.

Discussion

We studied the behavior of six cytokines related to the inflammatory activity of full-term and preterm infants, born in a tertiary hospital. Inflammatory reaction was present in infants and varies according to gestational age; it is possible to observe a relationship between the inflammatory reaction and unfavorable outcomes associated with prematurity. The pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-8 showed higher levels at earlier gestational ages, consistent with other studies and with the hypothesis that premature birth is associated

with an exacerbated inflammatory reaction and that demonstrated a correlation between the increase in pro-inflammatory cytokines (18,28,40,41).

Two diseases of primarily inflammatory origin, ROP and BPD, were associated with an increase in the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 and a decrease in the anti-inflammatory cytokine TGF- β 1. For each increase in IL-6, the chance of developing ROP increased by 16 times and for each increase in IL-8, the chance of developing BPD increased by 6 times; on the other hand, for each increase in TGF- β 1 the chance of developing BPD was reduced by 0.03 times. Associations of IL-6, IL-8 and TGF- β 1 with these diseases have already been described (13,26,42); however, without a quantitative description of the odds ratio model between an increase in the levels of cytokine and the chance of developing a disease.

The behavior of TNF- α shows conflicting results. We found higher plasma levels in extremely preterm infants and full-term infants than in the ones born between 28 and 33 weeks. There are mixed findings in the literature regarding TNF- α values (11,20,28). Studies that observed an increase in TNF- α in preterm infants suggest that this increase is linked to the inflammatory factors associated with the triggering of premature birth (28,43). When controlled for preeclampsia and chorioamnionitis, factors that contribute to an exacerbated inflammatory reaction, only the increase in cytokine for full-term infants remains, which corroborates this hypothesis. Studies that evaluated the capacity of TNF- α production by umbilical cord blood monocytes after ex vivo stimulation observed a greater production of this cytokine in full-term infants in relation to the ones born preterm (44–46).

We observed an increase in IL-6 in extremely preterm infants; however, when controlled for chorioamnionitis and preeclampsia, the effect of gestational age on IL-6 is nullified. This cytokine is a marker of the fetal systemic inflammatory response syndrome and is associated with intrauterine inflammatory conditions (11,19); furthermore, premature labor

can be triggered by an infectious or inflammatory condition (40,43), which may explain this effect observed in our study.

In a study that evaluated the production of IL-8 in umbilical cord monocytes of preterm infants after *ex vivo* stimulation, it was found an increase in the production of IL-8 in preterm infants younger than 32 weeks, especially in those with infectious signs (47). In line with findings in the literature (15,23,28,47), we also observed an increase in IL-8 in extremely preterm infants in comparison to the other two groups of infants. However, after controlling for chorioamnionitis and preeclampsia, we observed that the levels of IL-8 remain high for Group 1 in relation to Group 2, but in relation to Group 3, we observed only a tendency to maintain this difference. Association between chorioamnionitis and preeclampsia and levels of IL-8 have been previously described, and the inverse relationship between preeclampsia and IL-8 that we observed is consistent with previous findings in the literature (11,18,48).

IL-10 was found to be superior in infants between 28 and 33 weeks in relation to full-term infants; however, after controlling for preeclampsia and chorioamnionitis, this difference does not persist. IL-10 acts to prevent the immune rejection of the fetus during pregnancy and its decrease during pregnancy has been previously documented (23,28). The literature is inconsistent with regard to the levels of IL-10 and its relationship with gestational age, which may be similar or even increase in full-term infants in relation to the ones preterm (11,20,44). An increase in IL-10 in infants whose mothers had chorioamnionitis has also been reported (18).

Serum levels of TGF- β 1 and TGF- β 2 were higher in full-term infants; however, after controlling for chorioamnionitis and preeclampsia, the difference remained only for TGF- β 1 and between full-term infants and preterm infants younger than 28 weeks. The increase in TGF- β in full-term infants has been previously described in the literature (26), suggesting an important role for this cytokine in fetal development. These findings are also corroborated in

our study by the observation of a decrease in complications associated with prematurity (BPD, ROP and IVH) in preterm infants with higher levels of TGF- β 1 and TGF- β 2. When analyzing each cytokine individually, TGF- β 1 directly influences the risk of BPD, and the higher the serum level of TGF- β 1, the lower the risk of BPD. Findings of an association between the increase of this cytokine and a decrease in the occurrence of inflammatory diseases in preterm infants have been previously described in the literature (10,26).

One of the limitations of our study was the impossibility of completely eliminating the influence of the multiple factors involved in premature birth, maintaining exclusively the influence of gestational age on inflammatory activity, similar to previous studies. We cannot conclude the effects on periventricular leukomalacia and death due to the low occurrence of these outcomes in our sample. We also chose not to evaluate IL-1 β in our study because it was below the detection limit of the kit in a significant number of patients; however, other studies have also had similar difficulties, with IL-1 β not being detectable or detectable in only approximately 50% of patients (18,49).

On the other hand, a strong point of our study was the option of collecting blood from the infant in the first 72 hours of life, which allows assessing the inflammatory condition of the infant without the immediate influence of the labor, contrary to what happens in studies with umbilical cord blood (17). Because of the short half-life of cytokines, we made an effort to collect the samples as early as possible, with most of the samples obtained in the first 24 hours of life. We also observed minimal loss of information from maternal, prenatal and follow-up data due to a strict record of the information. When comparing the cytokine values for each group of infants, the statistical analysis was based on the results qualified by the planned comparisons, since the hypotheses predicted differences related to gestational age.

Our findings show significant differences in the inflammatory activity in the first days of life of full-term infants in comparison to the ones preterm. We also found that this altered

inflammatory activity still so early in life is related to the clinical outcomes associated with prematurity. A complex chain of events is related to the inflammatory activity of these patients and although we are unable to extinguish all aspects involved in this process, our study contributes to the understanding of inflammatory markers related to prematurity and their influence on neonatal outcomes.

Acknowledgments

This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); and the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research and Event Incentive Fund (FIPE/HCPA). The authors would like to thank the Protein and Molecular Analysis Laboratory/HCPA team for their support in the analysis of the samples and Priscila G. Brust-Renck for the statistical analysis.

References

1. Chawanpaiboon, S. *et al.* Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet. Glob. Heal.* **7**, e37--e46 (2019).
2. Harrison, M. S. & Goldenberg, R. L. Global burden of prematurity. in *Semin. Fetal Neonatal Med.* **21**, 74–79 (2016).
3. Leal, M. do C. *et al.* Prevalence and risk factors related to preterm birth in Brazil. *Reprod. Health* **13**, 127 (2016).
4. Platt, M. J. Outcomes in preterm infants. *Public Health* **128**, 399–403 (2014).
5. Ambalavanan, N. *et al.* Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* **123**, 1132–1141 (2009).
6. Dammann, O. & O’Shea, T. M. Cytokines and perinatal brain damage. *Clin. Perinatol.* **35**, 643–663 (2008).
7. Holm, M. *et al.* Systemic inflammation-associated proteins and retinopathy of prematurity in infants born before the 28th week of gestation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 6419–6428 (2017).
8. Leroy, S. *et al.* A Time-Based Analysis of Inflammation in Infants at Risk of Bronchopulmonary Dysplasia. *J. Pediatr.* **192**, 60-65.e1 (2018).
9. Leviton, A. *et al.* The relationship between early concentrations of 25 blood proteins and cerebral white matter injury in preterm newborns: the ELGAN study. *J. Pediatr.* **158**, 897–903 (2011).
10. Maheshwari, A. *et al.* Cytokines associated with necrotizing enterocolitis in extremely-low-birth-weight infants. *Pediatr. Res.* **76**, 100 (2014).

11. Otsubo, Y., Hashimoto, K., Kanbe, T., Sumi, M. & Moriuchi, H. Association of cord blood chemokines and other biomarkers with neonatal complications following intrauterine inflammation. *PLoS One* **12**, e0175082 (2017).
12. Procianoy, R. S. & Silveira, R. C. Association between high cytokine levels with white matter injury in preterm infants with sepsis. *Pediatr. Crit. Care Med.* **13**, 183–187 (2012).
13. Silveira, R. C., Fortes Filho, J. B. & Procianoy, R. S. Assessment of the contribution of cytokine plasma levels to detect retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 1297–1301 (2011).
14. Aghai, Z. H. *et al.* Impact of histological chorioamnionitis on tracheal aspirate cytokines in premature infants. *Am. J. Perinatol.* **29**, 567–572 (2012).
15. Dammann, O. *et al.* Mediators of fetal inflammation in extremely low gestational age newborns. *Cytokine* **13**, 234–239 (2001).
16. Romero, R. *et al.* Clinical chorioamnionitis at term II: the intra-amniotic inflammatory response. *J. Perinat. Med.* **44**, 5–22 (2016).
17. Sarandakou, A. *et al.* Inflammatory cytokines in newborn infants. *Mediators Inflamm.* **7**, 309–312 (1998).
18. Takahashi, N. *et al.* Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. *Cytokine* **49**, 331–337 (2010).
19. Gotsch, F. *et al.* The fetal inflammatory response syndrome. *Clin. Obstet. Gynecol.* **50**, 652–683 (2007).
20. Lyon, D. *et al.* Integrated review of cytokines in maternal, cord, and newborn blood: part I---associations with preterm birth. *Biol. Res. Nurs.* **11**, 371–376 (2010).

21. Opsjøn, S.-L. *et al.* Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **169**, 397–404 (1993).
22. Srinivasan, L., Harris, M. C. & Kilpatrick, L. E. Cytokines and inflammatory response in the fetus and neonate. In *Fetal and Neonatal Physiology* (eds. Polin, R. A., Abman, S. H., Rowitch, D. H., Benitz, W. E. & Fox, W. W.) 1241-1254.e4 (Elsevier, Philadelphia, 2017).
23. Blanco-Quirós, A. *et al.* Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *Eur. J. Pediatr.* **159**, 420–423 (2000).
24. Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K. L. & Flavell, R. A. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 99–146 (2006).
25. Sabat, R. *et al.* Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 331–344 (2010).
26. Takahashi, N. *et al.* Constitutively high-level expression of TGF- β isoforms in cord blood and its relationship to perinatal findings. *Cytokine* **73**, 101–107 (2015).
27. Nesin, M. & Cunningham-Rundles, S. Cytokines and neonates. *Am. J. Perinatol.* **17**, 393–404 (2000).
28. Matoba, N. *et al.* Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics* **123**, 1320–1328 (2009).
29. Fichorova, R. N. *et al.* Systemic inflammation in the extremely low gestational age newborn following maternal genitourinary infections. *Am. J. Reprod. Immunol.* **73**, 162–174 (2015).
30. McElrath, T. F. *et al.* Blood protein profiles of infants born before 28 weeks differ by pregnancy complication. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **204**, 418--e1 (2011).

31. Ballard, J. L. *et al.* New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J. Pediatr.* **119**, 417–423 (1991).
32. Capurro, H., Konichezky, S., Fonseca, D. & Caldeyro-Barcia, R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J. Pediatr.* **93**, 120–122 (1978).
33. Apgar, V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn. *Class. Pap. Crit. Care* **32**, 97 (1952).
34. Alexander, G., Himes, J., Kaufman, R., Mor, J. & Kogan, M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet. Gynecol.* **87**, 163–168 (1996).
35. Classification of Retinopathy of Prematurity. The International Classification of Retinopathy of Prematurity Revisited. *Arch. Ophthalmol.* **123**, 991 (2005).
36. Jobe, A. H. & Bancalari, E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 1723–1729 (2001).
37. Bell, M. J. *et al.* Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann. Surg.* **187**, 1 (1978).
38. Walsh, M. C. & Kliegman, R. M. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr. Clin. North Am.* **33**, 179–201 (1986).
39. Papile, L.-A., Burstein, J., Burstein, R. & Koffler, H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J. Pediatr.* **92**, 529–534 (1978).
40. Peltier, M. R. Immunology of term and preterm labor. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 122 (2003).
41. Romero, R. *et al.* A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **179**, 186–193 (1998).

42. Paananen, R. *et al.* Blood cytokines during the perinatal period in very preterm infants: relationship of inflammatory response and bronchopulmonary dysplasia. *J. Pediatr.* **154**, 39–43 (2009).
43. Cappelletti, M., Della Bella, S., Ferrazzi, E., Mavilio, D. & Divanovic, S. Inflammation and preterm birth. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 67–78 (2016).
44. Dembinski, J., Behrendt, D., Martini, R., Heep, A. & Bartmann, P. Modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production in very preterm infants. *Cytokine* **21**, 200–206 (2003).
45. Förster-Waldl, E. *et al.* Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. *Pediatr. Res.* **58**, 121 (2005).
46. Wisgrill, L. *et al.* Reduced TNF- α response in preterm neonates is associated with impaired nonclassic monocyte function. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 607–612 (2016).
47. Schultz, C. *et al.* Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr. Res.* **51**, 317 (2002).
48. Faulhaber, F. R. S., Silveira, R. C., Vargas, A. P. & Procianoy, R. S. Chemokines plasma levels in preterm newborns of preeclamptic mothers. *Cytokine* **56**, 515–519 (2011).
49. Tutdibi, E., Hunecke, A., Lindner, U., Monz, D. & Gortner, L. Levels of cytokines in umbilical cord blood in relation to spontaneous term labor. *J. Perinat. Med.* **40**, 527–532 (2012).

Tables**Table 1** - Maternal, perinatal and neonatal characteristics in the study groups

	Group 1 (n=29)	Group 2 (n=37)	Group 3 (n=37)	P value
Gender, male, n (%)	12 (41.38)	21 (56.76)	19 (51.35)	0.460
Maternal age, mean (SD), years	25.28 (5.89)	27.46 (6.35)	24.95 (6.77)	0.208
GA, mean (SD), weeks	26.53 (1.09)	31.06 (1.52)	39.36 (0.81)	< 0.001
Rupture of membranes, mean (SD), minutes	3842.07 (13299.46)	780.33 (1532.77)	424.7 (443.64)	0.010
Gestational Diabetes Mellitus, n (%)	2 (6.9)	1 (2.7)	2 (5.41)	0.720
Urinary tract infection, n (%)	5 (17.24)	5 (13.51)	6 (16.22)	0.891
Chorioamnionitis ^a , n (%)	15 (62.5)	11 (33.33)	0 (0)	< 0.001
Preeclampsia, n (%)	8 (27.59)	12 (32.43)	0 (0)	0.001
Antenatal steroids, n (%)	29 (100)	36 (97.3)	0 (0)	< 0.001
Vaginal delivery, n (%)	7 (24.14)	14 (37.84)	21 (56.76)	0.025
Birth weight, mean (SD), g	832.76 (182.08)	1419.86 (355.58)	3275.68 (407.74)	< 0.001
Birth weight for GA, n (%)				0.048
SGA	8 (27.59)	16 (43.24)	6 (16.22)	
AGA	21 (72.41)	21 (56.76)	29 (78.38)	
LGA	0 (0)	0 (0)	2 (5.41)	
Apgar score, median (p25-p75)				
1min	4.00 (3.00- 6.00)	7.00 (5.00- 8.00)	8.00 (8.00- 9.00)	< 0.001
5min	8.00 (7.00- 8.50)	9.00 (8.00- 9.00)	9.00 (9.00- 9.00)	< 0.001

GA gestational age, SGA small for gestational age, AGA adequate for gestational age, LGA large for gestational age

^aData available for 24 patients in Group 1 and 33 patients in Group 2.

Table 2 - Outcomes according to gestational age

	Group 1	Group 2	Group 1 vs Group 2 (<i>P</i> value)	Group 1 vs Group 2 vs Group 3 (<i>P</i> value)
BPD	26 (89.66)	7 (18.92)	< 0.001	< 0.001
ROP	15 (55.56)	3 (8.57)	< 0.001	< 0.001
NEC	9 (31.03)	11 (29.73)	0.909	0.001
HPIV	13 (44.83)	11 (29.73)	0.206	< 0.001
LPV	2 (6.9)	6 (16.22)	0.250	0.033
Death	3 (10.34)	3 (8.11)	0.754	0.156

BPD = Bronchopulmonary dysplasia. ROP = Retinopathy of prematurity. NEC = Necrotising enterocolitis. IVH = intraventricular hemorrhage PVL = Periventricular leukomalacia. Group 3 had no adverse outcome.

Table 3 - Inflammatory activity in the first 72 hours after birth according to gestational age

	Group 1 (n =29)	Group 2 (n = 37)	Group 3 (n = 37)	Difference		Covariance	
				P value	η_p^2	P value	η_p^2
TNF- α	27.3 (14.79 - 147.29)	26.51 (10.85 - 52.95)	46.88 (18.01 - 84.98)	< 0.001	0.191	< 0.001	0.251
IL-8	115.28 (14.83 - 1390.42)	55.23 (10.23 - 456.55)	36.31 (20.45 - 90.84)	< 0.001	0.178	0.006	0.107
IL-6	31.94 (0.89 - 7524.84)	19.92 (1.02 - 610)	6.96 (1.77 - 74.37)	0.005	0.099	> 0.10	0.047
IL-10	100.35 (9.15 - 793.51)	46.97 (7.11 - 2127.79)	20.22 (8.08 - 52.91)	0.05	0.057	> 0.10	0.046
TGF- β 1 ^a	6508.17 (942.43 - 28604.65)	8679 (2011.34 - 50347.97)	15430.13 (3676.2 - 68142.91)	0.001	0.146	0.037	0.075
TGF- β 2 ^a	474.02 (127.5 - 1098.77)	540.82 (262.79 - 1768.54)	665.15 (287.93 - 2768.4)	0.009	0.094	0.10	0.037

Notes. Cytokine values presented as median (min-max)

^a Results available for 32 patients in Group 3

* p < 0.05. ** p < 0.001

Table 4 - Correlation between outcomes and inflammatory activity

	BPD	ROP	NEC	IVH	PVL	Death
TNF- α	.02	-.03	.04	.04	-.06	.14
IL-8	.44**	.44**	.27**	.27**	.08	.09
IL-6	.30**	.36**	.13	.15	-.03	.14
IL-10	.18 [†]	.23*	.07	.16	.16	-.01
TGF- β 1	-.33**	-.24*	-.13	-.20*	-.10	-.08
TGF- β 2	-.25*	-.19 [†]	-.18 [†]	-.19 [†]	-.08	-.11

BPD = Bronchopulmonary dysplasia. ROP = Retinopathy of prematurity. NEC = Necrotising enterocolitis. IVH = intraventricular hemorrhage PVL = Periventricular leukomalacia.

Pearson's correlation

[†] $p < 0.10$. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

Table 5 - Predictive value of cytokines for BPD and ROP: two independently significant outcomes

	BPD		ROP	
	OR	CI 95%	OR	CI 95%
TNF- α	0.808	[0.325; 2.007]	0.643	[0.216; 1.911]
IL-8	6.099*	[1.5; 24.8]	1.823	[0.783; 4.244]
IL-6	27.442	[0.175; 4301.126]	16.226*	[0.962; 273.668]
IL-10	0.751	[0.437; 1.289]	1.107	[0.682; 1.796]
TGF- β 1	0.033*	[0.002; 0.591]	0.146	[0.007; 3.228]
TGF- β 2	7.14	[0.651; 78.294]	2.396	[0.179; 32.083]

OR = *Odds-ratio*. CI 95% Confidence Interval. BPD = Bronchopulmonary dysplasia. ROP = Retinopathy of prematurity.

Statistically significant values are in bold * $p < 0.05$.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nascimento é um momento de transição importante quando talvez mais mudanças ocorram simultaneamente no corpo humano, por isso uma complexidade em todos os mecanismos envolvidos neste processo não é surpreendente. É necessário que ocorra uma concatenação de eventos para que uma pessoa nasça, desde acontecimentos mais grosseiros até um fino ajuste de sinalização a nível molecular.

Neste estudo foram observadas diferenças significativas na atividade inflamatória de recém-nascidos a termo de recém-nascidos pré-termo nos primeiros dias de vida. Ainda mais, verificou-se que esta atividade inflamatória alterada ainda tão precocemente na vida está relacionada a desfechos clínicos nos pacientes pré-termo.

De maneira alguma propomo-nos a extinguir as investigações sobre este assunto; porém consideramos que nossos resultados contribuem para o entendimento da complexa cadeia de eventos envolvendo a prematuridade, quer corroborando dados previamente descritos na literatura, quer acrescentando informações pertinentes entre as diferenças entre recém-nascidos a termo e recém-nascidos pré-termo.

ANEXO A – PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

CÓDIGO RN _____ PRONT.: _____

SEXO: (1) masculino (2) feminino DN: __/__/__ DATA ALTA: __/__/_____

DADOS MATERNOS:

Idade materna: ___ anos Número gestações: _____ Pré-termos anteriores: (1) sim (2) não

Número consultas pré-natal: _____

PRÉ-ECLAMPSIA (1) sim (2) não

DMG/ DM: (1) sim (2) não (9) ignorado

ITU/Inf. ovular: (1) sim (2) não (9) ignorado

HAC: (1) s (2) n (9) ignorado BR: ___ horas (1) > 18h (2) < 18h (9) ignorado

LA: (1) alterado (2) claro/ normal (9) ignorado

Cultura de estrepto B: (1) positiva (2) negativa (8) não fez

Corticóide: (1) sim completo (2) não (3) sim incompleto (9) ignorado

DADOS DA INTERNAÇÃO HOSPITALAR:

Tempo de internação: ___ dias IGO: _____ sem Eco com _____ sem IG final: _____ sem PN:

_____g Comp: _____ cm PC: _____ cm IGP (Ballard, sem): _____ sem Classif. IG/P:

(1) AIG (2) PIG Percentil <3: (1) não (2) sim TAX na admissão: ___ Tipo de parto: (1)

vaginal (2) cesariana (9) ignorado

Indicação: _____

Apgar 1': _____ Apgar 5': _____ SNAPPE II: _____

Reanimação em sala de parto: (1) não precisou (2) O2 inalatório (3) VPP máscara

(4) VPP TET (5) MCE (6) drogas (7) CPAP em SP (9) ignorado

Surfactante sala de parto: (1) sim (2) não (9) ignorado

Surfactante outro momento: (1) sim (2) não (9) ignorado

Horas de vida na primeira dose: _____ horas Surfactante número total de doses: _____

Surfactante: (1) profilático (2) terapêutico (3) profilático e terapêutico (8) não usou

surfactante (9) ignorado

Sistema Respiratório:

DMH: (1) sim (2) não (9) ignorado

Hipertensão pulmonar: (1) sim (2) não (9) ignorado

BCP congênita: (1) sim (2) não (9) ignorado

BCP adquirida: (1) sim (2) não (9) ignorado

Pneumotórax: (1) sim (2) não (9) ignorado

TTRN: (1) sim (2) não (9) ignorado

VMAF: (1) sim (2) não (9) ignorado iNO: (1) sim (2) não (9) ignorado

Hemorragia pulmonar: (1)sim (2) não (9) ignorado

Adaptação Respiratória: (1) sim (2) não (9) ignorado

Tempo VM: dias VM não invasiva dias TCPAPn: dias

Oxigenioterapia: dias

DBP: (1) sim (2) não Corticóide para displasia broncopulmonar: (1) sim (2) não Apnéias: (1)

trat. c/ xantinas (2) xantinas e doxapram (8) não teve apnéias (9) ignorado Suspenso

tratamento com: _dv (___IG corrig) (9) ignorado

Suporte nutricional:

NPP AA nas 24h dv: (1) sim (2) não (9) ignorado Tempo de NPT: ___dias

Início da nutrição enteral: dv (/ /)

Enteral plena (150ml/kg/d): dv (/ /20)

Peso mínimo: g Peso mínimo: dv (/ /200) Recuper.

PN: dv (/ /20)

NPT plena (3g/kg/dia de AA) com 5dv: (1)sim (2)não (8) não usou NPT(9) ignorado

Acessos vasculares:

Epicutâneo (PICC): (1) sim (2) não (9) ignorado

Dissecção (flebo): (1) sim (2) não (9) ignorado

Cateterismo (umbilical): (1) sim (2) não (9) ignorado

Infecções:

Sepse precoce: (1) sim - dx clínico (2) sim – HMC positiva Germe: (8) não teve sepsse precoce

Sepse hospitalar: (1) sim – dx clínico (2) sim – HMC positiva Germe: (8) não teve sepsse tardia

Uso de antibióticos:

Data: Esquema

___/___/20___

___/___/20___

___/___/20___

___/___/20___

___/___/20___

Meningite neonatal: (1) sim (2) não (9) ignorado Germe: _____

ECN: (1) sim (2) não (9) ignorado

Necessidade de intervenção cirúrgica: (1) sim (2) não

Sistema Nervoso:

Convulsões neonatais: (1) sim (2) não (9) ignorado

HPIV: (0) não teve (1) grau I (2) grau II (3) grau III (4) grau IV (8) não fez eco cerebral

LPV: (1) sim (2) não (8) não fez eco

Ciclo sono-vigília: (1) ausente (2) imaturo (3) desenvolvido

Sistema Cardiovascular:

PCA: (1) dx ecocardio (2) dx clínico (8) não teve

PCA (9) ignorado Indometacina: (1) profilática (2) tratamento (3) profilático e tratamento (8) não usou (9) ignorado

Ibuprofeno: (1) profilática (2) tratamento (3) profilático e tratamento (8) não usou (9) ignorado Fez cirurgia para PCA: (1) sim (2) não

Drogas vasoativas nas primeiras 72 horas: (1) sim Quais: _____

Uso de CTC para choque: (1) sim (2) não

Outros:

Osteopenia (nível + alto de FA): Tratamento: (1) sim (2) não (3) não teve (9) ignorado

Transfusão de CHAD: ___ (número de transfusões)

Data da última transfusão: ___/___/200

Hipoglicemia: (1) sim (2) não (9) ignorado EIM: (1) sim (2) não (9) ignorado

Incompatibilidade ABO: (1) sim (2) não (9) ignorado

Exsanguíneo transfusão: (1) sim (2) não (9) ignorado

Uso de imunoglobulina para incompatibilidade ABO: (1) sim (2) não (9) ignorado

DADOS DA ALTA HOSPITALAR:

ROP:(0)semROP (1)ROP1 (2)ROP2 (3)ROP3 (4)ROP4 (5)ROP5 (8) não fez avaliação

Fez cirurgia para ROP: (1) sim (2) não (9) ignorado

OEA: (1) alterado unilateral (2) alterado bilateral (3) normal OEA

Exame neurológico: (1) alterado (2) normal (8) não realizado

Alta hospitalar com oxigênio: (1) sim (2) não

Peso:____ g Comp:____ cm PC:____ cm PB:____ cm

Alimentação: (1) SM exclusivo (2) Aleitamento misto (3) Fórmula exclusiva

Teste do pezinho: (1) normal (2) alterado (8) não foi feito (9) ignorado

IL-1 β ____ TNF- α ____ IL-8____ IL-6____ IL-10____ TGF- β 1____ TGF- β 2____

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - responsáveis

Nº do projeto GPPG ou CAAE 15-0537

Título do Projeto: O papel do microbioma intestinal e da resposta inflamatória aguda na sepse neonatal precoce no recém-nascido prematuro – Há uma associação preditiva?

Você e seu bebê estão sendo convidados a participar de uma pesquisa cujo objetivo é saber se existe uma ligação entre infecção precoce ou inflamação no recém-nascido com alterações nas populações de bactérias (germes) que habitam o intestino de bebês prematuros e de suas mães.

Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes:

Será coletada uma amostra de fezes da mãe. Também será coletada uma amostra de material vaginal da mãe através de um swab, que é parecido com um cotonete. Estas coletas serão realizadas durante a sua internação, somente após o aceite em participar da pesquisa e assinatura deste termo.

Será coletada a primeira eliminação de fezes do seu bebê que será retirada diretamente da fralda. Será coletado um pouco de sangue do bebê, uma amostra de 1ml, que é menos do que 1 colher de chá, para a realização de um exame de laboratório. Esta amostra será coletada durante coleta de sangue já realizada na rotina assistencial a pedido do médico assistente. Então seu filho (a) não será submetido à coleta de sangue exclusivamente para a pesquisa.

Também precisaremos acessar o seu prontuário e do bebê para a coleta de dados adicionais. Por isso, solicitamos sua autorização para este acesso.

As amostras coletadas serão utilizadas exclusivamente para esta pesquisa. Após a realização de todas as análises previstas para a pesquisa, as amostras serão descartadas.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são: Em relação à coleta de sangue, a quantidade de sangue é pequena não causando riscos para o paciente. Os riscos da própria coleta são pequenos e raros: sangramento, hematoma e dor no local da punção. A coleta das fezes do recém-nascido será feita diretamente da fralda após sua eliminação, sem riscos ao paciente. Da mesma forma, a coleta das fezes materna será feita após a sua eliminação, sem agregar riscos. A coleta do swab materno também é um procedimento simples, mas que pode causar desconforto no momento da coleta.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são:

Você e seu bebê não terão um benefício direto ao participar do estudo, mas irão contribuir para o melhor conhecimento dessa doença, a sepse precoce do recém-nascido, e de uma forma mais confiável para o seu diagnóstico.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que os participantes da pesquisa recebem ou possam vir a receber na instituição. Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Rita de Cássia Silveira e com a pesquisadora Dra. Laura Vargas Dornelles pelo telefone 33598794 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2o andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Assinatura (*se aplicável*)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO RECÉM-NASCIDO A TERMO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO RECÉM-NASCIDO A TERMO – responsáveis

No do projeto GPPG ou CAAE 17-0148

Título do Projeto: Marcadores inflamatórios precoces associados à enterocolite necrosante

Você e seu bebê estão sendo convidados a participar de uma pesquisa cujo objetivo é saber se existe uma ligação entre inflamação nos primeiros dias de vida do recém-nascido e o desenvolvimento posterior de enterocolite, uma doença infecciosa que afeta o intestino de recém-nascidos, principalmente de prematuros. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O bebê pelo qual você é responsável está sendo convidado por não ser prematuro e para comparação com os bebês prematuros. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes:

Será coletado um pouco de sangue do bebê, uma amostra de 1ml, que é menos do que 1 colher de chá, para a realização de um exame para avaliar proteínas relacionadas à resposta inflamatória. Esta amostra será coletada durante coleta de sangue já realizada na rotina assistencial a pedido do médico assistente. Então não haverá novas coletas de sangue exclusivamente para a pesquisa. Também precisaremos acessar o prontuário da mãe e do bebê para a coleta de dados adicionais (dados sobre a gestação, o nascimento e a internação do bebê). Por isso, solicitamos sua autorização para este acesso. A análise dessas proteínas não terá nenhuma repercussão no atendimento ao recém-nascido.

As amostras coletadas serão utilizadas exclusivamente para pesquisa. Após a realização de todas as análises previstas para a pesquisa, as amostras serão descartadas.

Não são conhecidos riscos pela coleta adicional de 1ml de sangue para a pesquisa. Sendo os riscos de coleta de sangue os mesmos da rotina de atendimento. Há um possível risco de quebra de confidencialidade, no entanto os pesquisadores utilizarão códigos para identificar o participante.

Você e seu bebê não terão um benefício direto ao participar do estudo, mas o estudo irá contribuir para o melhor conhecimento dessa doença, a enterocolite necrosante, e de uma possível forma de prever qual recém-nascido terá maior risco de desenvolver a doença.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que os participantes da pesquisa recebem ou possam vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, os participantes receberão todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Rita de Cássia Silveira e com a pesquisadora Dra. Laura Goergen Brust Rieck pelo telefone 33598794 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2o andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Assinatura (*se aplicável*)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Porto Alegre, ____ de _____ de 2017.